

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Nutrición y Bromatología II**



**Agregación de proteínas de músculo de pescado congelado.**  
**Acción del formaldehído**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Purificación Torrejón Ramos**

**Directora**

**Margarita Tejada Yabar**

**Madrid 2005**

**ISBN: 978-84-8466-949-4**

**© Purificación Torrejón Ramos, 1996**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**"AGREGACION DE PROTEINAS DE MUSCULO DE PESCADO  
CONGELADO. ACCION DEL FORMALDEHIDO"**

**Memoria que para optar al grado de**

**DOCTOR EN FARMACIA**

**presenta**

**PURIFICACION TORREJON RAMOS**

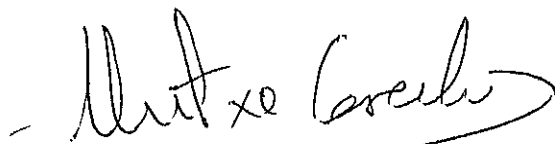
**INSTITUTO DEL FRIO**

**Madrid, 1996**

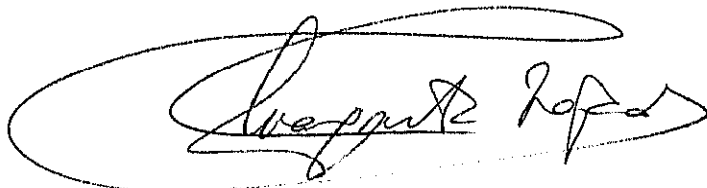
MERCEDES CARECHE RECACOECHEA, doctora en Ciencias Químicas, Colaboradora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y MARGARITA TEJADA YÁBAR, doctora en Veterinaria, Investigadora Científica del CSIC.

CERTIFICAN: Que el presente trabajo titulado "Agregación de proteínas de músculo de pescado congelado. Acción del formaldehído" y que constituye la Memoria que presenta la Licenciada Purificación Torrejón Ramos para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Instituto del Frío del CSIC bajo nuestra dirección

Y para que conste, firmamos el presente certificado en Madrid, a 10 de Mayo de 1996



Mercedes Careche Recacoechea



Margarita Tejada Yábar

## AGRADECIMIENTOS

Quiero dar muy especialmente las gracias a la Dras. Mercedes Careche Recacoechea y Margarita Tejada Yábar por dirigir este trabajo, por transmitirme optimismo en los momentos más difíciles y por su apoyo constante durante la realización del mismo.

A la dirección del Instituto del Frío (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) por las facilidades dadas para la realización de esta tesis.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por concederme una beca de Formación del Personal Investigador para la realización de esta tesis.

A la Dra. Laura Coll Hellín, por aceptar la ponencia de esta Tesis y por sus consejos y orientaciones.

Al Dr. D. Carlos Barba y a Dña. M<sup>a</sup> Luisa García, del Centro de Microscopía Electrónica de la UCM y a la Dra. Dña. M<sup>a</sup> Teresa Solas, del departamento de Biología Molecular de la Facultad de Biología, por su importante aportación a la presente tesis.

A las Doctoras Dña. Cristina Alvarez y Dña. Almudena Huidobro, por su apoyo y colaboración en el presente trabajo.

A los Doctores/as: D. A. Javier Borderías, D. José Carballo, Dña. Susana Cofrades, D. Francisco Jiménez-Colmenero, Dña. Pilar Montero y D. Antonio Moral por todos los consejos recibidos.

A los ayudantes de investigación Dña. M<sup>a</sup> Luisa Fernández, Dña. Carmen Mata y D. Jose Luis Corbí, que con su trabajo han contribuido a la realización de esta Tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio y de despacho, por su apoyo moral y su ayuda en todo momento.

A D<sup>a</sup> Laura Barrios del Centro de Cálculo del CSIC, por la colaboración prestada en la realización del tratamiento estadístico.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos FAR UP3 647 de la Comunidad Europea y ALI 94-095 CO2-01, de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.



**INDICE**

## 1. INTRODUCCION

### 1.1.- IMPORTANCIA DEL CONSUMO DE PESCADO EN ESPAÑA Y DEL ESTUDIO DE LA CONSERVACION POR CONGELACION DE PESCADO Y DERIVADOS

### 1.2.- CARACTERISTICAS GENERALES DEL MUSCULO Y PROTEINAS DE PESCADO

#### 1.2.1.- ESTRUCTURA DEL MUSCULO DE PESCADO

#### 1.2.2.- PROTEINAS DEL MUSCULO DE PESCADO

##### 1.2.2.1.- Proteínas contráctiles

##### 1.2.2.2.- Proteínas reguladoras y estructurales asociadas a microfilamentos

### 1.3.- ALTERACION DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES DE MUSCULO DE PESCADO DURANTE LA CONSERVACION EN CONGELACION

#### 1.3.1.- EVIDENCIA DE LA DESNATURALIZACION Y AGREGACION DE LAS PROTEINAS DE MUSCULO DE PESCADO DURANTE LA CONGELACION Y ALMACENAMIENTO EN CONGELACION

##### 1.3.1.1.- Estudios de extractabilidad de proteínas de músculo en distintos agentes durante la conservación en congelación

###### 1.3.1.1.1.- Estudios in situ

###### 1.3.1.1.2.- Estudios en sistema modelo

##### 1.3.1.2.- Actividad $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica

##### 1.3.1.3.- Grupos sulfhidrilo (-SH)

##### 1.3.1.4.- Hidrofobicidad superficial

#### 1.3.2.- CAUSAS DE LAS ALTERACIONES DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES DURANTE LA CONGELACION Y CONSERVACION EN CONGELACION

##### 1.3.2.1.- Cambios en el agua

##### 1.3.2.2.- Degradación del óxido de trimetilamina (OTMA). Accion del formaldehído (FA)

##### 1.3.2.3.- Lípidos y sus productos de degradación

##### 1.3.2.4.- Interacción entre las distintas causas de las alteraciones

1.3.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD  
DE DESNATURALIZACION DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES  
DURANTE LA CONGELACION Y CONSERVACION EN CONGELACION

1.3.3.1.- Especie y estacionalidad

1.3.3.2.- Velocidad de congelación

1.3.3.3.- Temperatura y tiempo de conservación

1.3.3.4.- Procesamiento del músculo

1.4.- NATURALEZA DEL PROCESO DE DESNATURALIZACION Y AGREGACION  
DURANTE LA CONSERVACION EN CONGELACION

2.- OBJETIVOS Y DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS

2.1.- OBJETIVOS

2.2.- DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS

3.- MATERIALES Y METODOS

3.1.- MATERIALES

3.1.1.- ESPECIES ESTUDIADAS

3.1.2.- REACTIVOS

3.1.3.- MEDIOS INSTRUMENTALES

3.2.- METODOLOGIA EMPLEADA

3.2.1.- PREPARACION DEL MUSCULO PICADO

3.2.2.- ANALISIS ELEMENTALES Y pH

3.2.3.- ANALISIS DE CONTROL DE CALIDAD DEL MUSCULO

- 3.2.3.1. – Solubilidad proteica (SOL/TOT)
- 3.2.3.1. – Viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ )
- 3.2.3.1. – Dimetilamina (DMA)
- 3.2.3.1. – Formaldehído (FA)
- 3.2.3.1. – Medida instrumental de textura (KRAMER)

### 3.2.4. – ESTUDIO DE EXTRACTABILIDAD DE PROTEINAS MIOFIBRILARES DE MUSCULO

- 3.2.4.1. – Extracción de actomiosina natural (AMN)
- 3.2.4.2. – Extractabilidad del agregado en Dodecilsulfato sódico (SDS) y  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME)

### 3.2.5. – MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION (MET)

### 3.2.6. – ANALISIS EN LAS FRACCIONES PROTEICAS EXTRAIDAS (S1, S2 y S3)

- 3.2.6.1. – Electroforesis (SDS-PAGE)
- 3.2.6.2. – Cromatografía de filtración en gel
- 3.2.6.3. – Actividad  $Ca^{2+}$  ATPásica
- 3.2.6.4. – Grupos sulfhidrilo (-SH)
- 3.2.6.5. – Hidrofobicidad superficial alifática (CPA) y aromática (ANS)
- 3.2.6.6. – Viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ )
- 3.2.6.7. – Índice de actividad de emulsión (IAE)

### 3.2.7. – SISTEMAS MODELO DE AMN AISLADA

- 3.2.7.1. – Estudio de la concentración de FA (SM1)
- 3.2.7.2. – Estudio de la agregación de AMN aislada (SM2)

### 3.2.8. – ANALISIS ESTADISTICO

## 4. – RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. – ANALISIS ELEMENTALES Y pH

### 4.2. – ANALISIS DE CONTROL DE CALIDAD DEL MUSCULO

- 4.2.1. – SOLUBILIDAD PROTEICA (SOL/TOT)

- 
- 4.2.2.- VISCOSIDAD APARENTE ( $\eta_{ap}$ )
  - 4.2.3.- DIMETILAMINA (DMA)
  - 4.2.4.- FORMALDEHIDO (FA)
  - 4.2.5.- MEDIDA INSTRUMENTAL DE TEXTURA (KRAMER)
  
  - 4.3.- ESTUDIO DE EXTRACTABILIDAD DE PROTEINAS MIOFIBRILARES DE MUSCULO
    - 4.3.1.- EXTRACTABILIDAD DE ACTOMIOSINA NATURAL (AMN) EN NaCl 0,6 M (S1)
    - 4.3.2.- EXTRACTABILIDAD EN SDS 2% (S2) DEL AGREGADO NO EXTRAIDO EN NaCl 0,6 M (P1)
    - 4.3.3.- EXTRACTABILIDAD EN SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) DEL AGREGADO NO EXTRAIDO EN SDS 2% (P2)
    - 4.3.4.- PROTEINA NO EXTRAIDA CON EL TRATAMIENTO APLICADO (P3)
    - 4.3.5.- NATURALEZA DE LA AGREGACION A LO LARGO DE LA CONSERVACION
  
  - 4.4.- ESTUDIO ELECTROFORETICO (SDS-PAGE) DE LAS FRACCIONES PROTEICAS EXTRAIDAS (S1, S2 Y S3)
    - 4.4.1.- PATRON ELECTROFORETICO DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS
    - 4.4.2.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DISTINTOS LOTES (B, BF, M, A) EN CADA FRACCION EXTRAIDA (S1, S2 y S3)
      - 4.4.2.1.- Cambios electroforéticos en la fracción S1 (NaCl 0,6 M )
      - 4.4.2.2.- Cambios electroforéticos en la fracción S2 (SDS 2%)
      - 4.4.2.3.- Cambios electroforéticos en la fracción S3 (SDS 2% +  $\beta$ -ME 5%)
    - 4.4.3.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DISTINTAS FRACCIONES (S1, S2, S3) EXTRAIDAS EN CADA LOTE (B, BF, M, A)
  
  - 4.5.- MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION (MET)

#### 4.6.- ANALISIS EN LA FRACCION EXTRAIDA EN NaCl 0,6 M (S1)

##### 4.6.1.- CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL

##### 4.6.2.- ACTIVIDAD $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica

##### 4.6.3.- GRUPOS SULFHIDRILO (-SH)

##### 4.6.4.- HIDROFOBICIDAD SUPERFICIAL (CPA Y ANS)

##### 4.6.5.- VISCOSIDAD APARENTE ( $\eta_{ap}$ )

##### 4.6.6.- INDICE DE ACTIVIDAD DE EMULSION (IAE)

#### 4.7.- SISTEMAS MODELO DE PROTEINA AISLADA

##### 4.7.1.- ESTUDIO DE LA CONCENTRACION DE FA (SM1)

###### 4.7.1.1.- Solubilidad en NaCl 0,6 M

###### 4.7.1.2.- Electroforesis (SDS-PAGE)

##### 4.7.2.- ESTUDIO DE LA AGREGACION DE AMN AISLADA (SM2)

###### 4.7.2.1.- Solubilidad en NaCl 0,6 M

###### 4.7.2.2.- Extractabilidad en SDS 2% (S2) del agregado insoluble en NaCl 0,6 M (P1)

###### 4.7.2.3.- Extractabilidad en SDS 2% + $\beta$ -ME 5% (S3) del agregado no extraído en SDS 2% (P2)

###### 4.7.2.4.- Proteína no extraída con el tratamiento aplicado (P3)

###### 4.7.2.5.- Naturaleza de la agregación a lo largo de la conservación

###### 4.7.2.6.- Electroforesis (SDS-PAGE)

#### 4.8.- CONSIDERACIONES GENERALES

### 5.- CONCLUSIONES

..

.

.

## INTRODUCCION

.

## 1.- INTRODUCCION

### 1.1.- CONSUMO DE PESCADO EN ESPAÑA. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA CONSERVACION POR CONGELACION DE PESCADO Y DERIVADOS

El pescado constituye una de las principales fuentes de proteínas de alto valor biológico, minerales y ácidos grasos beneficiosos para la salud (Herold y Kinsella, 1986).

España posee un nivel de consumo de pescado por persona al año de los más altos en el mundo y el mayor de la Unión Europea (UE). En nuestro país se consumen 37,1 Kg por persona al año mientras que en la UE la media es de 22,1 Kg (Moral y Tejada, 1993). Este mayor nivel queda reflejado en la figura 1.1., donde se representa el porcentaje de desviación respecto de la media en Europa de cada país en 1993 (M.A.P.A., 1995). El consumo anual total en 1993 fue aproximadamente de 802.669 millones de Kg (M.A.P.A., 1995). En la figura 1.2. se representa el porcentaje del gasto en pescado frente al gasto total en productos alimenticios en nuestro país (M.A.P.A., 1995). A diferencia de otros países, el rango de especies consumidas en España ha sido tradicionalmente grande. En la actualidad, parte de la demanda se satisface a través de la compra a otros países de Europa y de fuera de la UE.

En los últimos años se está dando gran importancia a la utilización de músculo picado tanto para el consumo directo como para la elaboración de productos alternativos. Pero tanto el pescado como sus derivados son altamente perecederos y, en general, pueden mantener su frescura solamente durante un periodo de varios días si se almacenan en hielo. Así, aunque algunos de los productos que no se consumen en fresco se sometan a métodos de conservación como la salazón o el ahumado, la mayoría de ellos se comercializan de forma congelada. En España se comercializaron 179.995 Kg de pescado congelado en 1993, lo cual supuso aproximadamente un 25% de la cantidad total de pescado consumida en dicho año (M.A.P.A., 1995).

La congelación es un método excelente para prevenir la putrefacción y autólisis del músculo de pescado sin alterar de manera importante sus características organolépticas y,



además, permite el consumo y la importación de especies cuyos caladeros están muy alejados de nuestro país. Sin embargo, el pescado congelado se deteriora cuando los periodos de almacenamiento son largos y este deterioro es más rápido que el que tiene lugar en la carne de animales de abasto conservada por congelación. Así, cuando el pescado ha sido congelado y almacenado durante largo tiempo, al descongelarlo, puede presentar cambios en aroma, color y textura. Además, cuando se cocina se observan otras alteraciones como dureza, pérdida de jugosidad, aumento de elasticidad y cambios en sabor y olor (Matsumoto, 1979 y Shenouda, 1980).

Las alteraciones se aceleran cuando el pescado es previamente picado antes de ser congelado con respecto a cuando se conserva en forma de filetes debido a la rotura de tejidos durante la obtención de la pasta (Babbit y col., 1972; Wheaton y Lawson, 1985). Estas dependen también de la especie, siendo un hecho comprobado que los cambios en textura afectan sobre todo a las especies del orden gadiformes (bacalao, merluza, bacaladilla, etc.), que presentan cantidades considerables de óxido de trimetilamina (OTMA) que, durante el almacenamiento en congelación se degrada a dimetilamina (DMA) y formaldehído (FA) en cantidades equimoleculares (Castell y col., 1971). Este último reacciona con distintos componentes del tejido muscular (proteínas, aminoácidos etc.) y a él se le atribuyen los mayores cambios en textura durante la conservación en estado congelado observados en estas especies (Amano y Yamada, 1964; Childs, 1973; Castell y col., 1973; Tokunaga, 1974; Dingle y col., 1977; Gill y col., 1979; Poulter y Lawrie, 1979; Parking y Hultin, 1982; Owusu-Ansah y Hultin, 1987; Carecho y Tejada, 1991, entre otros).

Algunas de estas especies magras se comercializan frecuentemente congeladas (merluza y pescadilla). Otras, como la bacaladilla, se consumen fundamentalmente en fresco por su peor comportamiento durante la conservación por congelación. En ambos casos el estudio de las alteraciones durante la conservación por congelación es de gran interés e importancia económica.

### CONSUMO DE PESCADO EN LA UE PORCENTAJES RESPECTO A LA MEDIA

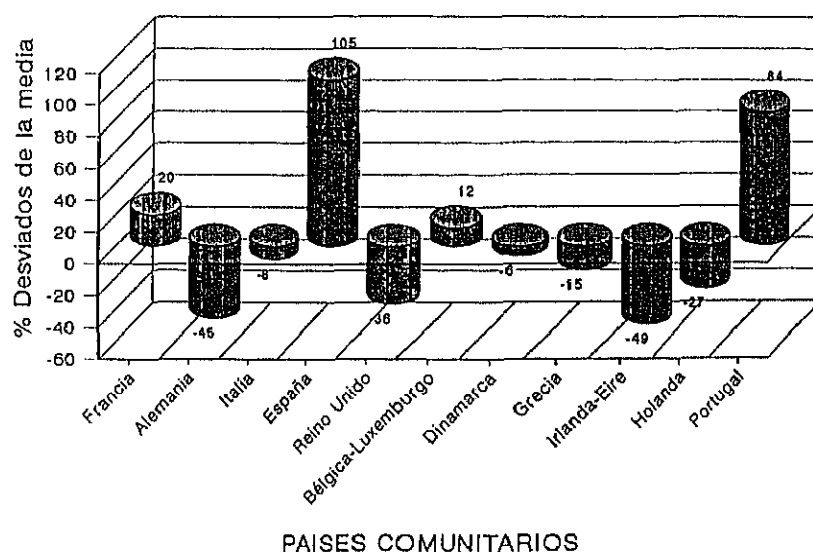


Figura 1.1.- Consumo de pescado en la UE. Porcentajes respecto a la media (M.A.P.A., 1995)

### EVOLUCION DE LA ESTRUCTURA DEL GASTO

PORCENTAJE RESPECTO AL GASTO TOTAL

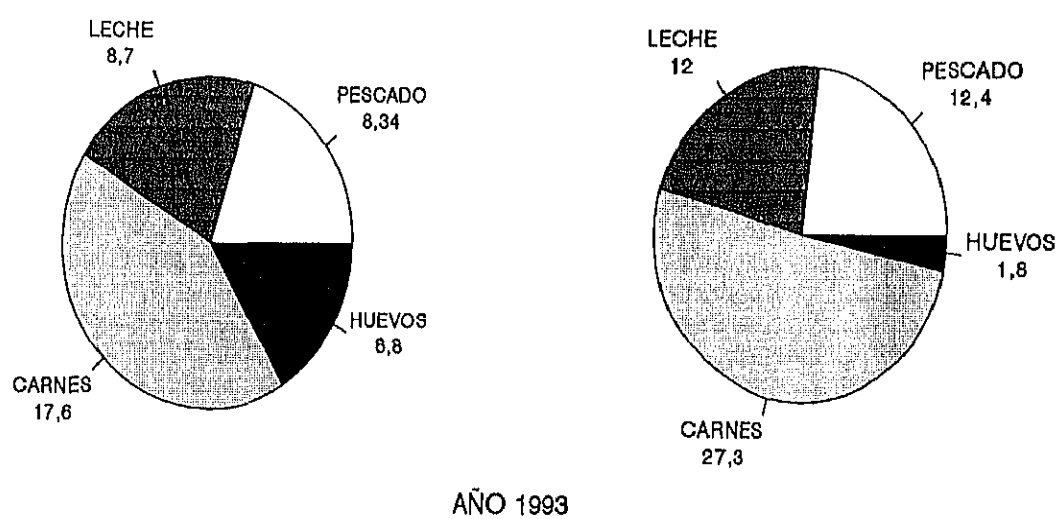


Figura 1.2.- Evolución de la estructura del gasto en pescados y otros alimentos. Porcentaje respecto al gasto total (M.A.P.A., 1995)

## 1.2.- CARACTERISTICAS GENERALES DEL MUSCULO Y PROTEINAS DE PESCADO

La asociación entre el fenómeno de la desnaturalización proteica y los cambios en textura durante la conservación en congelación fue postulada hace más de 60 años por Reay (1933). Desde entonces se han realizado múltiples trabajos en los que se relacionan los cambios en las proteínas del músculo, especialmente miofibrilares, con los observados en calidad del pescado durante la congelación y conservación.

El conocimiento, a rasgos generales, de la estructura del músculo de pescado y de las características de las proteínas que lo forman es necesario para poder entender las principales alteraciones que tienen lugar en el músculo y proteínas miofibrilares durante la congelación y conservación por congelación.

### 1.2.1.- ESTRUCTURA DEL MUSCULO DE PESCADO

Hay tres tipos de músculo: músculo estriado, que constituye la carne de los animales de abasto o del pescado; músculo liso, que se encuentra en los moluscos o en las vísceras y músculo cardíaco, con una estructura intermedia entre los otros dos. El músculo estriado está formado por grupos de fibras musculares, que son células multinucleadas de aspecto estriado cuando se observan al microscopio. Estas constituyen la unidad básica del músculo estriado (Grassé, 1977). Las fibras musculares van paralelas unas a otras dentro del miotomo. Estos están separados por capas de tejido conectivo que se denominan mioseptos. Los miotomos se disponen formando una W en ángulo con el eje longitudinal del pez (Young, 1977; Grassé, 1977).

El músculo de pescado es fundamentalmente estriado y puede clasificarse principalmente en músculo blanco y músculo rojo. En especies magras, el músculo rojo se encuentra fundamentalmente localizado a lo largo de la línea lateral del cuerpo del pez (Suzuki, 1987). La forma y volumen del músculo rojo varía dependiendo de la especie como se puede ver en la figura 1.3.

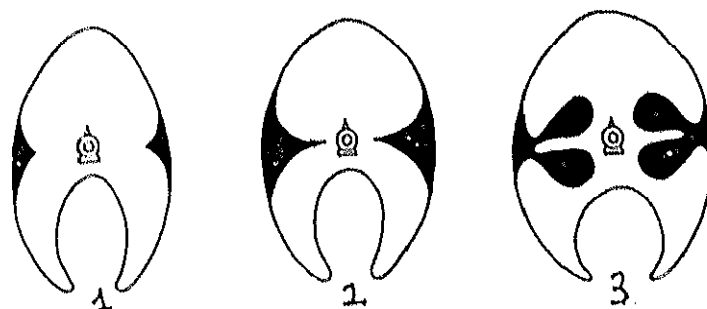


Figura 1.3.- Músculo rojo y blanco: 1: Gádidos, 2: Cupleidos, 3: Salmónidos (Suzuki, 1987)

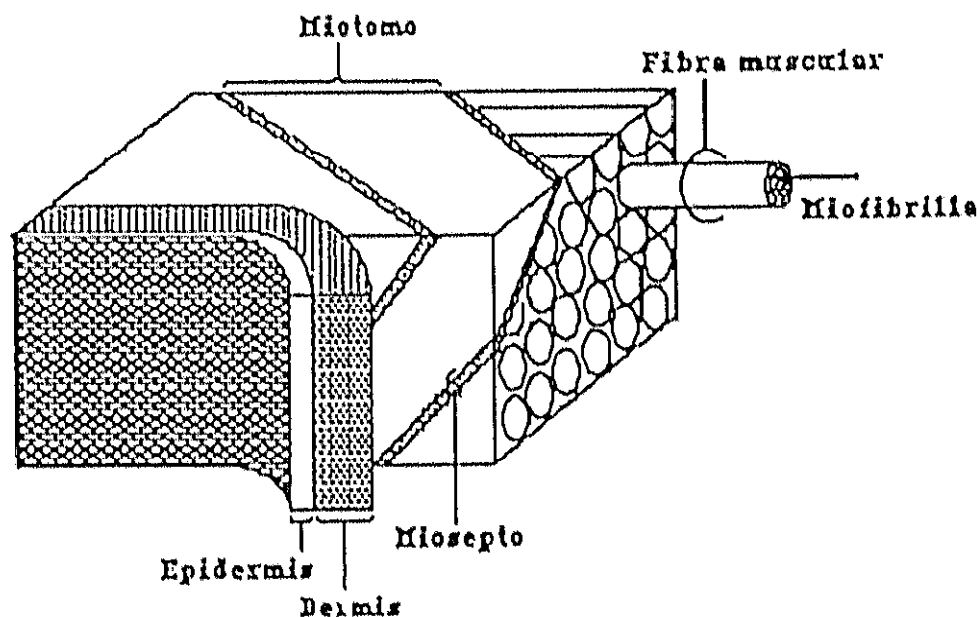


Figura 1.4.- Esquema de un corte de músculo de pescado (Suzuki, 1987; Slinde, 1988).

Si se observa una sección transversal del pescado, se aprecia que los miotomos de las zonas dorsal y ventral están ordenados en círculos concéntricos (Suzuki, 1987).

La figura 1.4. es una representación en aumento de una parte de músculo de pescado. En ella se observa que las fibras musculares, que son la unidad básica constituyente del músculo, están unidas unas a otras por medio del endomisio formando los miotomos. Estos están separados a su vez por mioseptos. Ambos tabiques están formados por tejido conjuntivo (Slinde, 1988). La longitud y grosor de las fibras musculares difiere de una especie a otra y son menores en músculo rojo (Suzuki, 1987).

Las fibras musculares, a su vez, están formadas por muchas miofibrillas paralelas y por el sarcoplasma, que ocupa el espacio entre ellas. Estas contienen un alto número de núcleos que se encuentran situadas hacia el exterior, cerca de la membrana celular o sarcolema (Grassé, 1977).

El músculo estriado muestra una marcada anisotropía cuando se observa al microscopio (figura 1.5.). Esto es debido a la organización molecular de su unidad básica o miofibrilla, cuya estructura se representa en la figura 1.6. En ella se distinguen la banda I (banda isotrópica) y la banda A (anisotrópica) las cuales se suceden alternativamente en la estructura de la miofibrilla. La línea o disco Z ocupa el centro de la banda I y la banda H, ligeramente más clara, se encuentra en el centro de la banda A. En el centro de la banda H se encuentra la línea M. Por la disposición de las miofibrillas existe coincidencia de las distintas bandas y esto hace que en su conjunto el músculo presente aspecto estriado. La unidad básica de la miofibrilla se denomina sarcómero y comprende desde un disco Z hasta el siguiente (Suzuki, 1987) (figura 1.5.). En la figura 1.5. se observan dos filamentos de distinto grosor. La miosina es el principal constituyente de los filamentos gruesos y la actina de los filamentos finos. Las distintas bandas que se observan en la miofibrilla son consecuencia de la disposición sistemática de estos filamentos. Entre las miofibrillas se encuentran pequeñas cantidades de sarcoplasma, mitocondrias, gránulos de glucógeno y retículo sarcoplásmico (Grassé, 1977).

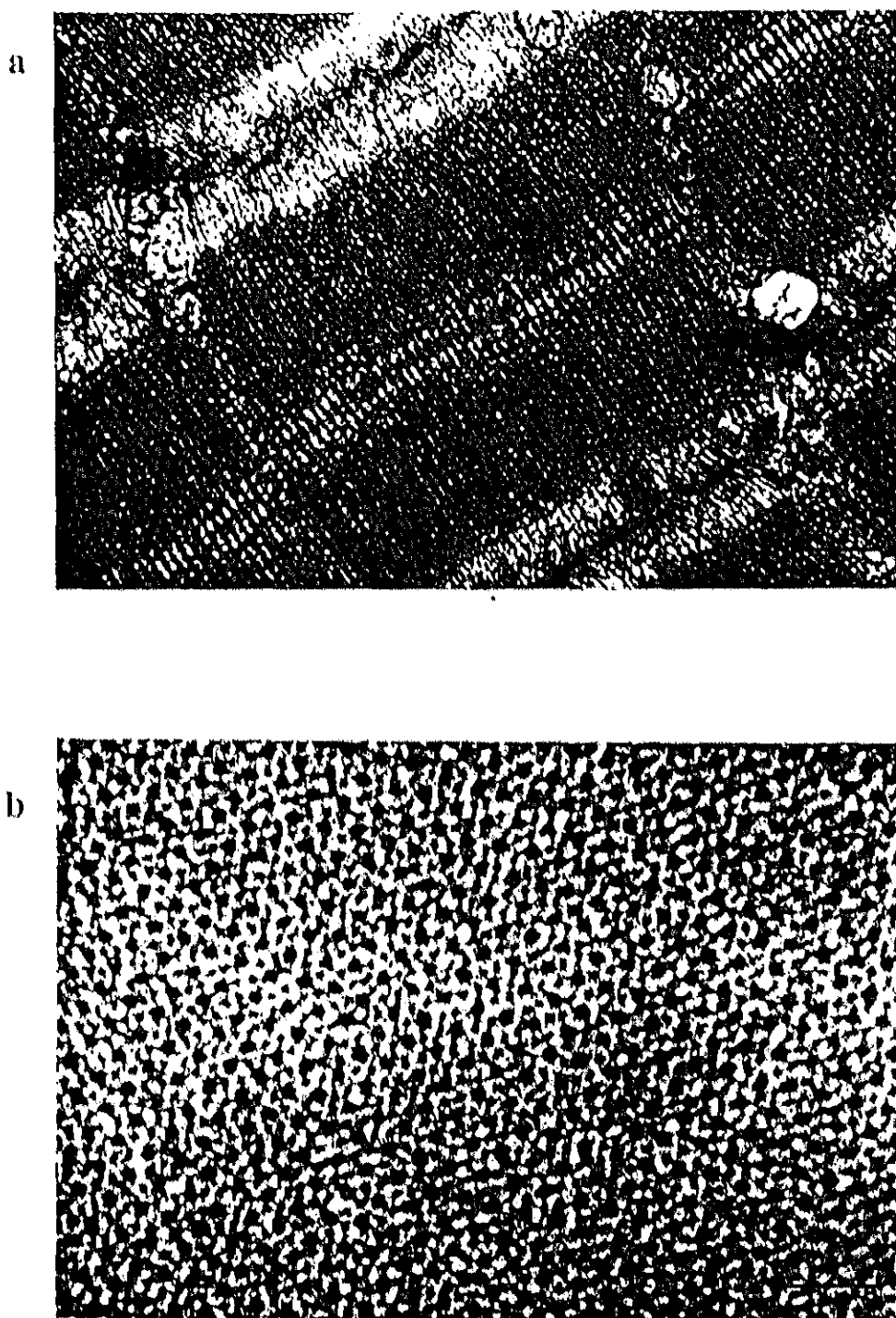


Figura 1.5.- Fotografías al microscopio electrónico de una sección longitudinal (a) y transversal (b) de músculo estriado de bacalao. Tamaño de la barra: 0,25  $\mu\text{m}$  (a) y 0,9  $\mu\text{m}$  (b) (Cedidas por Barba, C; Solas, M. T. y García, M.L. Centro de microscopía electrónica (UCM)).

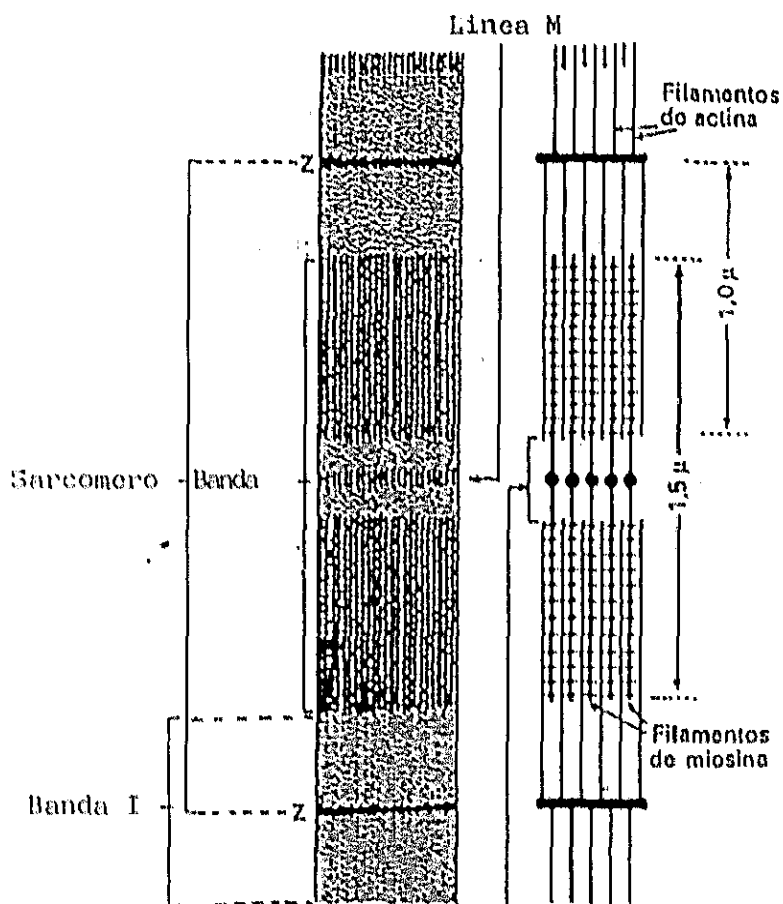


Figura 1.6.- Esquema de la estructura de la miofibrilla (Maillet, 1980).

### 1.2.2.- PROTEINAS DEL MUSCULO DE PESCADO

Las proteínas de músculo de pescado se dividen en proteínas sarcoplásmicas, que se localizan en el sarcoplasma y proteínas miofibrilares, que forman las miofibrillas. El tejido conectivo forma parte del estroma. La carne de los animales de abasto tiene una composición similar aunque contiene más estroma que el pescado.

Las proteínas sarcoplásmicas están formadas por muchos tipos de proteínas solubles en agua, llamadas en conjunto miógeno, que se pueden obtener simplemente aplicando presión sobre el músculo de pescado o por extracción con soluciones salinas de baja fuerza iónica (Suzuki, 1987). Se encuentran en el interior de la célula en concentración de hasta un 20% y son fundamentalmente enzimas responsables del metabolismo celular (Mackie, 1993). El contenido en proteínas sarcoplásmicas del músculo de pescado varía con la especie, pero en general es más alta en pescados pelágicos tales como la sardina y la caballa e inferior en los demersales tales como el bacalao, la merluza o la platija (Suzuki, 1987).

El comportamiento de las proteína miofibrilares, y en especial las contráctiles, durante la conservación en congelación ha sido objeto de numerosos estudios (recientemente revisados por Haard (1990) y Mackie (1993), entre otros) por su relación con las propiedades funcionales y textura del músculo. Debido a ello, en el presente trabajo se dedicará especial atención a la descripción y papel fisiológico de este grupo de proteínas.

#### **1.2.2.1.-Proteínas miofibrilares**

Las proteínas miofibrilares son las que forman las miofibrillas. Estas constituyen aproximadamente el 66–77% de las proteínas totales del músculo esquelético (Suzuki, 1987) y un 10% de su peso seco (Obinata y col., 1981). Entre estas, las mayoritarias son la miosina y la actina (Obinata y col., 1981). En el caso del músculo de pescado, la actina, miosina, troponina, tropomiosina y otras proteínas miofibrilares se extraen simultáneamente en soluciones salinas de alta fuerza iónica ( $>0,3$ ). Esta mezcla de proteínas miofibrilares se denomina actomiosina natural (AMN) (Suzuki, 1987).

Las proteínas miofibrilares se pueden dividir en 3 grupos: contráctiles, reguladoras y estructurales asociadas a microfilamentos (Alberts y col., 1992).



### 1.2.2.1.1.- Proteínas miofibrilares contráctiles

Son las que intervienen directamente en el fenómeno físico de la contracción muscular. Constituyen la mayor proporción de las proteínas miofibrilares. Las más abundantes son miosina y actina, que constituyen el 60 y 20% de las proteínas miofibrilares totales respectivamente (Obinata y col., 1981).

#### Actina

La actina es una proteína globular compuesta de una única cadena polipeptídica. Cada monómero de esta se une a una molécula de nucleótido (ATP o ADP) y a un catión divalente ( $\text{Ca}^{2+}$  ó  $\text{Mg}^{2+}$ ). Aunque la geometría básica del filamento de actina se conoce desde hace años, por medio del estudio de difracción de rayos X, en los pasados 10 años se ha profundizado bastante en el conocimiento de la estructura primaria de la actina y de sus variaciones hasta llegar al conocimiento de su estructura tridimensional (Pollard y col., 1994).

De acuerdo con Elzinga y col. (1976) la cadena polipeptídica de la actina se compone de 374 residuos. Su peso molecular oscila entre 41 y 42,3 kDa, incluyendo  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP. Contiene cinco grupos sulfhidrilo ( $-\text{SH}$ ). El aminoácido cisteína 217 está implicado en la unión de la actina a nucleótidos.

La actina purificada ó G-actina se encuentra en forma globular y polimeriza a F-actina, que tiene forma filamentosa, a concentraciones salinas fisiológicas. La F-actina posee una estructura de dos cadenas enrolladas una alrededor de la otra en doble hélice con un diámetro aproximado de 6nm. Estas dobles hélices, junto con las proteínas reguladoras forman los filamentos finos de las miofibrillas. En la figura 1.7. se representa un esquema del filamento de actina (Alberts y col., 1992).

La forma funcional de la actina es un filamento que interacciona con los filamentos de miosina y se desplaza a lo largo de estos durante la contracción muscular (Squire, 1994).

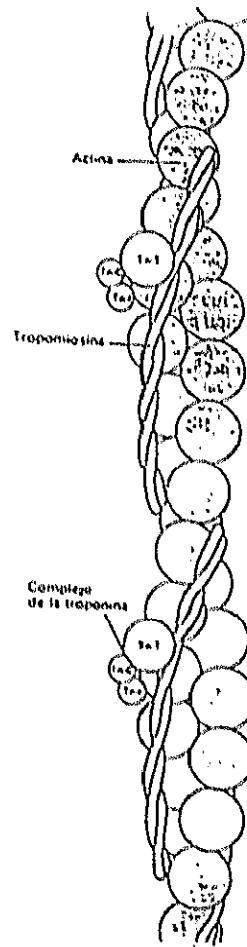


Figura 1.7.- Representación esquemática del filamento de actina y complejo regulador (Alberts y col., 1992)

## Miosina

La miosina del músculo esquelético (figura 1.8.) de vertebrados es una molécula hexamérica muy asimétrica consistente en dos cabezas globulares y una porción a modo de bastón o cola que consiste en dos  $\alpha$ -hélices superenrolladas en el 50% de su longitud. Esta porción es responsable de la asociación entre las moléculas para formar los filamentos gruesos de las bandas A de la miofibrilla. La molécula de miosina tiene un peso molecular de aproximadamente 500 kDa. Las cabezas globulares tienen unidas por enlaces no covalentes

dos cadenas pequeñas, denominadas cadenas ligeras que difieren en su estructura y propiedades. Estas se clasifican en reguladoras, de peso molecular aproximado entre 16 y 20 kDa y esenciales, de peso molecular aproximado entre 16 y 20 kDa. En las cabezas globulares se localiza la actividad ATPásica. Cada cabeza contiene un sitio específico para la unión con el ATP e hidrólisis del mismo. También posee sitios de unión con la actina y cadenas ligeras (Harrington y Rodgers, 1984). Recientemente se ha resuelto su estructura tridimensional (Rayment y Holden, 1993).

Como se ha indicado, la miosina es el componente fundamental de las bandas A de la miofibrilla, formando los filamentos gruesos de la misma. A través de su cabeza globular interacciona con los filamentos de actina, produciéndose el desplazamiento de los mismos durante la contracción muscular tras la fijación e hidrólisis del ATP por la miosina (Huxley, 1972). En la actualidad el estudio del mecanismo de la contracción muscular es de gran interés y se han realizado varias revisiones de los trabajos publicados en este campo (Rayment y Holden, 1993; Harrington y Rodgers, 1984; Warrick y Spudich., 1987; Howard, 1994; Squire, 1994; Vale, 1994).

En contraste con la similitud que se encuentra en los perfiles electroforéticos entre las cadenas pesadas de distintos tipos de músculos y especies, el patrón electroforético de las cadenas ligeras de miosina de distinta procedencia varía considerablemente (Watabe y col., 1983 y Martínez y col., 1990).

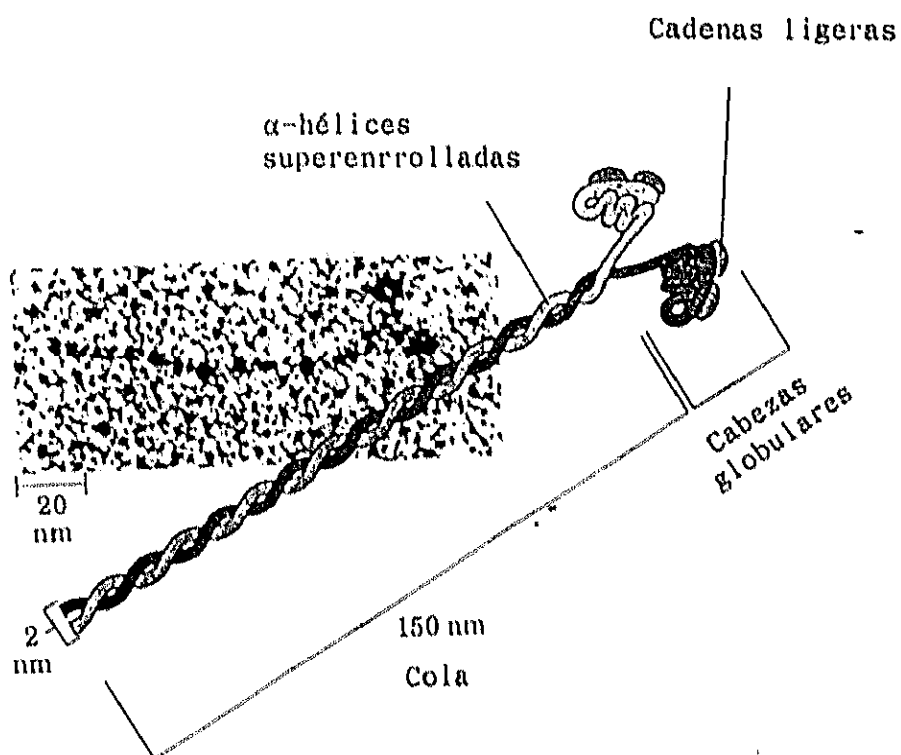


Figura 1.8.- Representación esquemática de la molécula de miosina en comparación con la imagen que esta presenta al microscopio electrónico (Lehninger y col., 1993)

#### 1.2.2.2.- Proteínas miofibrilares reguladoras y estructurales unidas a miofilamentos

##### Proteínas miofibrilares reguladoras

Como su nombre indica, están implicadas en la regulación de las funciones fisiológicas de las otras proteínas miofibrilares. Las proteínas reguladoras se dividen a su vez en mayores y menores.

## Proteínas reguladoras mayores

La tropomiosina y troponina son las proteínas reguladoras mayores y están implicadas en la regulación de la contracción muscular por medio de los iones  $\text{Ca}^{2+}$ .

La tropomiosina es una molécula de estructura  $\alpha$ -helicoidal y aproximadamente 41nm de longitud. Consiste en dos subunidades, de las cuales hay dos tipos,  $\alpha$  y  $\beta$  que se pueden separar por SDS-PAGE (Pollard y col., 1994).

La base fisiológica de las propiedades funcionales de la tropomiosina es su unión estequiométrica a la actina (1 a 7 moléculas de actina) y su unión 1:1 a la troponina T. La tropomiosina puede ocupar dos posiciones alternativas en el filamento de actina, en la periferia durante la relajación y cerca del interior durante la contracción. Esta dislocación de las cadenas de tropomiosina en los filamentos finos es esencial para la regulación de la contracción muscular por el  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la troponina (Obinata y col., 1981; Squire, 1994).

La troponina está localizada en los filamentos finos de la miofibrilla con una periodicidad de 40 nm y está unida a la tropomiosina en el filamento de actina. La proporción actina : tropomiosina : troponina es 7 : 1 : 1. La troponina está compuesta de tres moléculas: troponinas C, I y T de pesos moleculares entre 17 y 33 kDa aproximadamente (Obinata y col., 1981). La troponina C (TNC) se une al  $\text{Ca}^{2+}$ , la troponina I (TNI) tiene una acción inhibitoria de la interacción actina-miosina y la troponina T (TNT) se une a la tropomiosina (Betchel, 1986). Esta proteína miofibrilar es la única capaz de fijar el  $\text{Ca}^{2+}$  en concentraciones de  $10^{-8}\text{M}$ . Cuando la troponina fija el  $\text{Ca}^{2+}$ , su conformación cambia y este cambio estructural permite la interacción actina-miosina a través de cambios en la molécula de tropomiosina (Squire, 1994). De este modo la actina puede unirse a la miosina en la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  y ATP y provocar el deslizamiento de los filamentos finos sobre los de gruesos (Obinata y col., 1981; Squire, 1994).

### Proteínas reguladoras menores

Hay diversos tipos, asociadas con filamentos de actina o miosina. Entre ellas se encuentran las proteínas M, C, I y actininas. Las proteínas reguladoras menores se encargan principalmente de mantener la estructura finamente ordenada de las miofibrillas.

La proteína **M** es un péptido de 165 kDa de peso molecular y estructura helicoidal unido a la molécula de miosina. En la estructura de la miofibrilla se localiza a nivel de la línea M. La proteína **C**, por su parte tiene un peso molecular de 135 kDa y también se encuentra unida a la miosina. En la miofibrilla se localiza en la banda A. La proteína **I** está localizada en la banda A y su peso molecular es de 50 kDa. Las **actininas** tienen la misión de regular el estado físico de la actina. Se han descrito cinco especies de actininas: ABP (actin-binding protein), euactinina,  $\alpha$ -actinina,  $\beta$ -actinina,  $\lambda$ -actinina) de peso molecular entre 240 (actin-binding protein) y 35 ( $\lambda$ -actinina) kDa y la mayoría se localizan en la línea Z, excepto la  $\beta$ -actinina que se encuentra en el extremo libre de la actina en cada sarcómero (Obinata y col., 1981).

### Proteínas estructurales asociadas a microfilamentos

Las proteínas estructurales asociadas a microfilamentos son las implicadas en el mantenimiento de la integridad estructural de la miofibrilla.

Entre ellas está la **conectina** (PM 42.000), que forma una red tridimensional de filamentos muy finos que unen líneas Z vecinas y mantiene la continuidad longitudinal de la miofibrilla (Bachtel, 1986), la **desmina** (PM 55.000) que también une discos Z de miofibrillas adyacentes (Obinata y col., 1981, Bechtel, 1986) y la **proteína Z** (PM 55.000) que forma las estructuras reticulares observadas en la línea Z (Obinata y col., 1981).

### **1.3.- ALTERACION DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES DE MUSCULO DE PESCADO DURANTE LA CONSERVACION EN CONGELACION**

El Instituto Internacional del Frío (IIF, 1990) considera que un alimento está congelado cuando la mayoría del agua congelable está en forma de hielo. Con la congelación se pretende conservar la integridad y la calidad minimizando los cambios físicos, químicos y microbianos, tanto en el proceso de congelación como durante la conservación, de forma que, al descongelar el pescado, este tenga unas características parecidas a las del producto fresco. En general, en condiciones adecuadas de congelación y conservación, los principales responsables de la pérdida de la calidad del pescado son los cambios en la actividad de agua debido a la congelación del agua de los tejidos y las reacciones químicas y enzimáticas que, aunque entretardadas, continúan durante la conservación.

Como ya se ha indicado, parte de los cambios producidos durante la congelación y conservación de pescado afectan a la textura, especialmente en especies del orden gadiformes (apartado 1.1.). Estos cambios en textura se deben fundamentalmente a la desnaturalización y agregación de las proteínas miofibrilares del músculo (revisiones de Matsumoto (1980), Shenouda (1980) y Mackie (1993), entre otras). Las alteraciones de las proteínas miofibrilares durante la congelación y conservación en congelación, además de disminuir la calidad organoléptica del pescado congelado, limitan la utilidad del mismo como materia prima para la fabricación de productos derivados (Jimenez-Colmenero y Borderías, 1983).

#### **1.3.1.- EVIDENCIA DE LA DESNATURALIZACION Y AGREGACION DE LAS PROTEINAS DE MUSCULO DE PESCADO DURANTE LA CONGELACION Y CONSERVACION EN CONGELACION**

Debido a la gran cantidad de trabajos realizados en este campo, existe en la actualidad un cuerpo de información que cubre un amplio rango de especies de pescado almacenadas en una gran variedad de condiciones. Estos estudios se pueden clasificar de forma general en:

- Estudios *in situ*, en los que el músculo se almacena en estado congelado realizándose

controles periódicos sobre las proteínas constituyentes del mismo.

– Estudios en los que la proteínas previamente aisladas se almacenan en estado congelado en forma de sistemas modelo. Aunque las condiciones de almacenamiento de la proteínas nunca son equivalentes a las de los estudios *in situ*, este tipo de aproximaciones pueden dar información que permite interpretar mejor ciertos mecanismos.

En general, los estudios en sistema modelo realizados (Ohta, 1985; Niwa y col, 1986 a y b; Jiang y col., 1987 a y b; Ang y Hultin, 1989; Jiang y col., 1989; Chen y col., 1989; Careche y Tejada, 1991 y 1994; Del Mazo y col., 1993 entre otros) ponen de manifiesto que la congelación y conservación en congelación provoca alteraciones más rápidas en la proteínas aisladas que en las que se encuentran integradas en la estructura del músculo .

#### **1.3.1.1.– Estudios de extractabilidad y solubilidad en distintos agentes de proteínas de músculo durante la conservación en congelación**

Los términos extractabilidad y solubilidad han sido utilizados a menudo en la literatura indistintamente pudiendo llevar a confusión en algunos casos (Xion, 1994). La solubilidad proteica se considera la cantidad de proteína que permanece en una solución de determinadas características después de centrifugar en unas condiciones concretas de tiempo y fuerza centrífuga. La extractabilidad se entiende como la capacidad de liberar las proteínas de la estructura de la que se encuentran formando parte (ya sea músculo o agregado) por medio de la ruptura de determinados enlaces, tras la aplicación de un tratamiento dado. Así, muchas proteínas no pueden ser extraídas debido a que la formación de ciertos enlaces impiden el acceso del agente en cuestión, sin embargo si pudieran extraerse puede que fueran solubilizadas por dicho agente (Xiong, 1994; Stefansson y Hultin, 1994). Además, el término solubilidad debe tratarse con precaución cuando se usa con la palabra proteína, porque la proteína solubilizada puede constituir una dispersión coloidal en lugar de una solución verdadera. De hecho en algunos estudios se ha empleado el término más correcto de capacidad de las proteínas de ser suspendidas o dispersadas (Li-Chan y col., 1986).



En vista de lo anteriormente expuesto, en el presente estudio se utilizó el término extractabilidad en todos los estudios en los que se trata con distintos agentes tanto músculo como proteína agregada. En los estudios sobre proteína aislada en soluciones salinas, se utilizó el término solubilidad, teniendo en cuenta siempre que no se trata de soluciones verdaderas, sino dispersiones coloidales.

#### 1.3.1.1.1.- Estudios *in situ*

##### Extractabilidad de proteínas de músculo en soluciones salinas

Desde que Reay (1933) observó que cuando el pescado era almacenado en congelación había una disminución de la cantidad de proteína extraíble en soluciones salinas y dedujo la existencia de una asociación entre la desnaturalización proteica y el endurecimiento del músculo de pescado durante el almacenamiento en congelación, se han llevado a cabo múltiples estudios en los que se incluía la medida de los cambios de extractabilidad de proteínas miofibrilares. Dyer y col. (1956) perfeccionaron el método de extracción reduciendo la temperatura por debajo de 5°C, manteniendo el pH entre 7 y 9 y utilizando una concentración de sal entre 3 y 5%. Dyer y Dingle (1961) observaron posteriormente que la extractabilidad de las proteínas sarcoplásmicas se afecta bastante poco por el almacenamiento en congelación y que la disminución de la extractabilidad de proteínas en sal que se observa es fundamentalmente debida a la menor extractabilidad de proteínas miofibrilares. Esto ha sido confirmado posteriormente por otros autores (Tejada y col., 1984; Gonzalez, 1991). La observación general de todos estos estudios es que la extractabilidad disminuye con la conservación en congelación y que se relacionaba con un incremento en la dureza del músculo. La extractabilidad de proteínas miofibrilares nos da una medida indirecta del proceso de desnaturalización y agregación de las mismas durante la conservación.

Es importante tener en cuenta que en la mayoría de los estudios *in situ* la cantidad relativa de las proteínas miofibrilares (miosina, actina, complejo actina-miosina, tropomiosina,

etc.) en los extractos en soluciones salinas puede cambiar a lo largo de la conservación en congelación (Dingle y Hines, 1975; Shenouda, 1980; Matsumoto, 1980; Laird y Mackie, 1981; Huidobro y Tejada, 1995) y esta distinta composición puede influir en las determinaciones que se realicen sobre dichos extractos (Cofrades, 1994).

### **Extractabilidad de proteínas de músculo en distintos agentes**

Además de en soluciones salinas, se han realizado también estudios de extractabilidad de proteínas de músculo mediante el uso de detergentes como dodecil sulfato sódico (SDS). Este agente puede romper enlaces secundarios y la medida de la proteína solubilizada en SDS es un indicador de la participación de uniones secundarias en la agregación de la proteína (Owusu-Ansah y Hultin, 1987; Roussel y Cheftel, 1990; Edelstein, 1991a). Así, algunos autores han demostrado que incluso el músculo muy deteriorado por la conservación en congelación puede ser disuelto casi totalmente por medio de este detergente (Connell, 1965; Laird y Mackie, 1982; Rehbein y Karl, 1985; Ragnarsson y Regenstein 1989). Sin embargo, en otros estudios (Dingle y col., 1977; Lim y Haard, 1984) se ha encontrado una participación menor de dichos enlaces en la agregación. En estudios de extractabilidad de proteínas de músculo utilizando, además de SDS,  $\beta$ -Mercaptoetanol ( $\beta$ -ME), que es un agente reductor que rompe los enlaces S-S (Edelstein, 1991 b), se sugirió la intervención de estos enlaces en la agregación durante la conservación en congelación (Matthews y col., 1980; Lim y Haard, 1984 y Owusu-Ansah y Hultin, 1986).

Cuando la proteína extraída con SDS o SDS y  $\beta$ -ME empleados se examinó por SDS-PAGE, se observó la presencia de agregados proteicos de peso molecular alto que no entraban en los geles de poliacrilamida o en la zona entre la banda de la cadena pesada de miosina y la zona de aplicación del gel (Matthews y col., 1980; Laird y Mackie, 1982; Lim y Haard, 1984; Owusu Ansah y Hultin 1987; Ragnarsson y Regenstein, 1989). Estos agregados serían de naturaleza covalente, dado que el tratamiento de la muestra para SDS-PAGE se realiza en presencia de  $\beta$ -ME.

Connell (1975) realizó estudios de extractabilidad de músculo adicionando FA antes

de congelar y observó que este provocaba una disminución de la extractabilidad en SDS, siendo su efecto distinto al producido por la misma concentración de FA formado endógenamente por el músculo durante la conservación en congelación.

En general, los estudios de solubilidad en distintos agentes en músculo conservado en congelación sugieren la participación de enlaces secundarios, S-S y covalentes en la agregación. Sin embargo la diversidad de condiciones empleadas no permite extraer conclusiones generales en cuanto a la implicación de cada tipo de enlace en la agregación ni en cuanto a los cambios en esta implicación a lo largo del tiempo de conservación. Para ello es necesario realizar estudios de solubilidad en los distintos agentes en condiciones estandarizadas en distintas especies.

#### 1.3.1.1.2.- Estudios en sistema modelo

También se han realizado numerosos estudios en sistema modelo de solubilidad en soluciones salinas de proteína previamente aislada durante la conservación en congelación. En general se produce un descenso de la misma que depende de la metodología empleada y de las características de la muestra de partida (Tsuchiya y col. 1979; Jiang y col., 1988 a y b y 1989; Ang y Hultin, 1989; Careche y Tejada, 1991; Del Mazo y col., 1993; Careche y Tejada, 1994; Cofrades, 1994)

Existen en la literatura estudios de extractabilidad con distintos agentes sobre proteína agregada en sistema modelo (Tsuchiya y col., 1979; Jiang y col., 1988 a y b y 1989; Chen y col., 1989 y Cofrades, 1994). Tsuchiya y col. (1979), en estudios sobre AMN de carpa consiguieron demostrar la participación de uniones secundarias y enlaces S-S en la agregación. Posteriormente, los estudios de Jiang y col. (1988 a y b y 1989), en AMN aislada de sabalote y tilapia, y de Chang y col. (1989) en miosina aislada de sabalote, corroboraron los resultados de Tsuchiya y col. (1979), y pusieron de manifiesto un incremento en la participación de las interacciones covalentes a medida que aumentaba el periodo de conservación. Estos autores indicaron que los enlaces covalentes eran los que más contribuían a la agregación durante la conservación en congelación. El trabajo de solubilidad y

extractabilidad realizado por Cofrades (1994) con AMN de merluza conservada en congelación puso de manifiesto la mayor contribución de las interacciones secundarias en la agregación.

Algunos autores han realizado estudios sobre la acción del FA sobre la solubilidad y/o extractabilidad de proteína miofibrilar aislada y conservada en congelación (Ang y Hultin, 1989; Cofrades, 1994). Estos autores observaron cambios en la solubilidad de la proteína en soluciones salinas y en la proporción de los distintos enlaces implicados la agregación por efecto de la adición de FA.

Los estudios de extractabilidad y solubilidad de proteína miofibrilar durante la conservación en congelación realizados hasta ahora indican que los enlaces implicados en la agregación son de naturaleza secundaria, S-S y covalentes no S-S. Sin embargo, no se ha estudiado la influencia de variables como la especie de pescado, procesamiento de la muestra o tipo de estudio: *in situ* o en sistema modelo. Esto, unido a la diferente metodología empleada en estos estudios no permite extraer conclusiones generales en cuanto a la participación de los distintos enlaces implicados en la agregación y de sus cambios a lo largo del tiempo de conservación. Por lo tanto, es necesario realizar estudios con una metodología estandarizada que pongan de manifiesto la influencia de estas variables en la naturaleza de la agregación.

### 1.3.1.2.- Actividad $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica

La actividad enzimática de una proteína es a menudo un indicador sensible de los cambios en conformación de la molécula en las zonas adyacentes al centro activo. La medida de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica ha sido un método empleado en muchos estudios de conservación por congelación en músculo de pescado por estar relacionada muy estrechamente con los cambios producidos en la cabeza de la miosina, que es la parte de la molécula que contiene tanto la localización activa del enzima como el sitio de unión a la actina (apartado 1.2.2.1.). La actividad  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPásica se asocia a la interacción entre la miosina y la actina en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  mientras que la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica es un buen indicador de la

funcionalidad de la miosina en las proteínas contráctiles (Roura y Crupkin, 1995). La actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica de músculo disminuye durante la conservación en congelación, como ha sido observado por distintos autores revisados por Matsumoto (1980), Shenouda (1980) y Mackie (1993), entre otros. Este descenso se ha observado también en estudios en sistema modelo con actomiosina aislada de distintas especies de pescado conservados en congelación (Tsuchiya y col., 1979; Roura y col., 1990; Careche y Tejada, 1991; Del Mazo y col., 1993, entre otros). Diversos autores han postulado que el descenso observado en actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica de la actomiosina o miosina aisladas durante la conservación en congelación estaba relacionado con la oxidación de grupos  $-\text{SH}$  en zonas activas de la molécula (Buttkus, 1971; Hamada, 1977; Chen, 1989; Jiang y col., 1989). También se ha demostrado que la miosina pierde su actividad más rápidamente que la actomiosina (Noguchi y Matsumoto, 1970; Matsumoto, 1979, Chen y col., 1989), lo cual sugiere que la actina ejerce un efecto protector.

### 1.3.1.3.- Grupos sulfhidrilo ( $-\text{SH}$ )

Los grupos  $-\text{SH}$  se consideran importantes para el mantenimiento de la estructura de las proteínas nativas. También se sabe que los grupos  $-\text{SH}$  pueden oxidarse formando enlaces  $\text{S}-\text{S}$  intra e intermoleculares durante el proceso de desnaturalización de las proteínas (Buttkus, 1974; Lehninger y col., 1993) por lo que desde hace tiempo ha habido interés por conocer si este tipo de enlace covalente ocurre en las proteínas del tejido muscular durante su conservación en congelación.

En los distintos trabajos recogidos en la bibliografía se determinaron los grupos  $\text{SH}$  totales, para lo cual se desnaturalizó previamente la proteína con urea, lo que permitió el acceso del reactivo de detección a todos los restos  $-\text{SH}$  de la proteína. En algunos trabajos se determinaron además los grupos  $-\text{SH}$  disponibles, para lo cual se realizó la medida sin someter a la proteína a desnaturalización previa con urea.

Los primeros estudios acerca de cambios en el número de grupos  $-\text{SH}$  (disponibles y totales) durante la conservación en congelación de músculo de pescado y proteínas miofibrilares aisladas, realizados por Connell (1960 a y b y 1964), indicaron que no había

cambios importantes en el número de los mismos. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Poulter y Lawrie (1978), los cuales señalaron que la complejidad de las reacciones de intercambio entre grupos sulfhidrilos y enlaces disulfuro podría explicar la no detección de cambios en el número neto de grupos -SH durante la conservación. Sin embargo, Buttkus, (1970, 1971), en trucha, Jiang y col. (1988 a y b y 1989), en sabalote y tilapia y LeBlanc y LeBlanc (1992), en bacalao, demostraron que tenía lugar una disminución del número de grupos -SH disponibles y totales en las proteínas miofibrilares aislada de estas especies durante la conservación en congelación. Por tanto, aunque se sabe que la formación de enlaces S-S a partir de grupos -SH interviene en la agregación de proteínas miofibrilares (apartado 1.3.1.2.), existen contradicciones en la literatura en relación a los cambios en grupos -SH totales, -SH disponibles y S-S con la temperatura y tiempo de conservación en congelación (Mackie, 1993).

#### 1.3.1.4.- Hidrofobicidad superficial

Se puede determinar el cambio de hidrofobicidad de las proteínas determinando la fluorescencia que emiten ciertos compuestos como el ácido cis-parinárico (CPA) y 8-anilino-1-naftalen sulfato (ANS) cuando se unen a las proteínas. Ambos compuestos se unen por interacciones hidrofóbicas a restos alifáticos (CPA) y aromáticos (ANS) y su capacidad de emisión fluorescente se incrementa por efecto de esta interacción (Li-Chan y Nakai, 1990). Un aumento en la hidrofobicidad es indicativo de un mayor ambiente hidrofóbico característico de la proteína en estado desnaturalizado, ya que esta tiende a exponer hacia el exterior grupos hidrofóbicos que normalmente se encuentran en el interior de la estructura terciaria de la misma (Li-Chan y Nakai, 1990).

Se han realizado pocos trabajos *in situ* y en sistema modelo acerca de los cambios ocurridos en hidrofobicidad de proteínas de músculo de pescado durante la congelación y posterior conservación en estado congelado (Niwa y col., 1986 a y b; Owusu Ansah y Hultin, 1987; Ang y Hultin, 1989; LeBlanc y LeBlanc, 1992; Cofrades, 1994). La mayoría de los datos de que se dispone proceden de estudios de desnaturalización proteica por calor. Es difícil

atribuir los cambios que se encuentran en hidrofobicidad durante el tratamiento frigorífico a las mismas causas a las que se atribuyen los cambios por calor. Aunque en ambos casos se produce una desnaturalización proteica y una agregación, es muy probable que el mecanismo por el que transcurre dicho proceso sea distinto.

Diversos autores (Li-Chan y col., 1985; ; Hayakawa y Nakai, 1985; Niwa y col., 1986 a y b; Jiménez-Colmenero y col., 1991; Del Mazo y col., 1993), indicaron que los procesos de congelación-descongelación de proteínas en solución aumentan su hidrofobicidad con o sin pérdida de solubilidad. También se ha observado que la hidrofobicidad se correlaciona inversamente con la extractabilidad de las proteínas (Owusu-Ansah y Hultin, 1987).

LeBlanc y LeBlanc (1992), en estudios *in situ*, observaron un aumento en la hidrofobicidad de las proteínas miofibrilares tras un año de almacenamiento de músculo de bacalao. Sin embargo, excepto este caso, en la bibliografía no se encuentra un seguimiento de los cambios en hidrofobicidad de la proteína *in situ* a lo largo del tiempo durante períodos de almacenamiento largos.

### **1.3.2.- CAUSAS DEL LAS ALTERACIONES DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES DURANTE LA CONGELACION Y CONSERVACION EN CONGELACION**

Como ya se ha indicado, las alteraciones de las proteínas miofibrilares durante la congelación y conservación en congelación están causadas fundamentalmente por los cambios en el agua de los tejidos y por determinadas reacciones químicas y enzimáticas que continúan produciéndose a bajas temperaturas. Entre estas últimas cabe destacar la degradación del óxido de trimetilamina (OTMA) y de los lípidos.

#### **1.3.2.1.- Cambios en el agua**

La congelación del agua tisular es una de las causas del deterioro del músculo durante

la congelación y conservación en congelación. Aunque algunas primeras observaciones sugerían que esto era debido fundamentalmente a la formación de cristales de hielo de gran tamaño, estudios más recientes demostraron este fenómeno físico se da sólo a velocidades de enfriamiento muy lentas. Cuando se forman grandes cristales extracelulares, estos provocan que las fibras musculares encojan y se apelmacen. Así, cuando el músculo se descongela desprende gran cantidad de exudado y presenta una textura seca y "estropajosa" (IIF, 1990; Tejada, 1995).

Por otro lado, la congelación del agua del medio produce un incremento de la concentración salina en la fase acuosa no congelada (crioconcentración), lo cual constituye una causa importante de desnaturalización y agregación de las proteínas. Esto es debido a que, a concentraciones altas, algunos iones compiten con el agua por los sitios hidrofílicos de la proteína y ello puede conducir a una disminución de la hidratación de las proteínas y pérdida de solubilidad (Matsumoto, 1979). Además, al tener lugar un cambio en la hidratación de los iones, se produce una redistribución de los puentes de hidrógeno y uniones hidrofóbicas en la proteína, las cuales participan en el mantenimiento de la conformación nativa de la proteína (Lewin, 1974; Sikorski y Kolakowska, 1994).

#### 1.3.2.2.- Degradación del óxido de trimetilamina (OTMA). Acción del formaldehído (FA)

El compuesto químico OTMA se encuentra presente en organismos marinos y está generalmente ausente en peces de agua dulce. Las cantidades más altas se encuentran en elasmobranquios y teleósteos y su concentración varía ampliamente, siendo mayor en las especies pertenecientes al orden gadiformes y menor en peces planos como lenguado o platija. También se encuentra en grandes concentraciones en algunos moluscos y crustáceos (Mackie, 1993).

La degradación del OTMA está implicada posiblemente en la osmoregulación y funciona como un medio de excreción de nitrógeno. En la actualidad está claro que la metabolización de este compuesto se produce a través de la enzima OTMA-desmetilasa (Sikorski y Kostuch, 1982; Lundstrom y col., 1982; Rehbein, 1988; Hultin, 1992 a).



Durante la conservación en congelación, la degradación del OTMA por acción de la OTMA-desmetilasa da lugar a la formación de FA y dimetilamina (DMA) en cantidades equimoleculares (Castell y col., 1971). Dicha enzima, a diferencia del OTMA, se encuentra sólo en algunas especies, fundamentalmente del orden gadiformes (Sikorski y Kostuch, 1982; Rehbein, 1988; Haard, 1992; Hultin, 1992 a; Sikorski y Kolakowska, 1994). Esta ha sido localizada en mucha mayor concentración en la sangre, hígado, riñones y otros órganos que en el músculo (Sikorski y Kostuch, 1982; Hultin, 1992 a). Así, dependiendo de la cantidad de sangre y vísceras que se dispersen en el músculo blanco durante el procesado, tendrán lugar diferentes velocidades de ruptura de OTMA (Mackie, 1993; Sikorski y Kolakowska, 1994).

Desde que en 1965 Amano y Yamada encontraron que en músculo conservado en congelación tenía lugar la producción de FA y DMA simultáneamente, numerosos estudios se han centrado en su formación y efecto sobre la desnaturalización y agregación proteica en pescado conservado en congelación (revisados recientemente por Careche y Reece, 1992; Haard, 1990; Hultin, 1992 a; Sotelo y col., 1995). Distintos autores (Castell, 1971; Gill y col., 1979; Rehbein, 1988) encontraron que la formación de FA y DMA así como los cambios en textura y solubilidad proteica en gadiformes dependían de la especie.

Parte del FA generado por la descomposición del OTMA puede interaccionar con compuestos de bajo peso molecular (nucleótidos, aminoácidos, creatinina, etc.) y con proteínas (Banda y Hultin, 1983; Rehbein, 1985). Sin embargo, se cree que este reacciona fundamentalmente con proteínas. En estudios en sistema modelo, empleando FA y seroalbúmina bovina a 37°C, se ha demostrado que el FA se une analíticamente a tres niveles distintos (Tome y col., 1979). Parte del FA se une de modo reversible, formando restos hidroximetilo, particularmente al reaccionar con el grupo  $\alpha$ -amino de restos de lisina. Este puede ser liberado por medio de diálisis. Otra parte del FA está unido a las proteínas formando grupos hidroximetilo o puentes metileno entre lisina y otros aminoácidos como arginina, asparragina o glutamina. Este se extrae con ácidos. El FA resistente a la extracción con ácidos se encuentra formando compuestos como metil-lisina, formil-lisina y puentes metileno entre lisina y tirosina.

Castell y col. (1973) propusieron que el FA actuaba como responsable de la desnaturalización proteica a través de la formación de puentes metileno interproteicos. Otros autores han sugerido que tiene lugar un primer estado en el que se forman puentes disulfuro que favorecen el posterior establecimiento de interacciones covalentes (Matthews y col., 1980). Matthews y col. (1980); Owusu-Ansah y Hultin (1986 y 1987) y Ragnarsson y Regenstein, (1989) encontraron que la formación de FA iba acompañada de la aparición de agregados de naturaleza covalente en músculo de gádidos almacenado en congelación. Ang y Hultin (1989) observaron que la cantidad de enlaces covalentes que se forman entre las proteínas en músculo de bacalao durante la conservación en congelación estaba relacionada con la cantidad de FA añadido. Parte del FA formado durante la conservación en congelación podría unirse a las proteínas por medio de interacciones secundarias (Hultin, 1992 a) o no reaccionar con estas, pudiendo ser extraído. Algunos autores encontraron que el FA aceleraba la desnaturalización proteica sin que tuviera lugar necesariamente la formación de enlaces covalentes (revisados por Hultin, 1992 a; Careche y Reece, 1992). En estudios en sistema modelo con proteína miofibrilar se ha demostrado la acción agregante del FA y su efecto sobre la alteración de la conformación de las proteínas previa a la agregación (Ang y Hultin, 1989; Del Mazo y col., 1993; Cofrades, 1994).

Desde el punto de vista químico, la reacción del FA con la proteína se ve afectada por factores como la temperatura (Ang y Hultin, 1989), pH (Rehbein, 1985; Kostuch y Sikorski, 1977) y tipo de proteína (Castell y col., 1973). *In situ*, esta reacción depende además de la reactividad del FA, la velocidad de formación del mismo, su disponibilidad y el estado de la proteína (Rehbein, 1985; Sotelo y col., 1995). En general, el FA reacciona más con las proteínas miofibrilares que con las sarcoplásmicas (Ohnishi y Rodger, 1979).

Aunque el mayor deterioro de las propiedades funcionales de las proteínas miofibrilares durante la conservación en congelación en especies de gadiformes se ha relacionado con la formación y acumulación de FA (Gill y col., 1979; Laird y col., 1981; Owusu Ansah y Hultin, 1986; Jahncke y col, 1992), ciertas especies experimentan pérdidas de extractabilidad en condiciones en que no tiene lugar apenas formación de FA (Laird y col., 1981; Owusu Ansah y Hultin, 1986; Careche y Tejada, 1990 b y 1991). Sin embargo, la complejidad de los

cambios químicos y físicos que tienen lugar durante el almacenamiento en congelación de músculo de pescado hace pensar que es difícil que un sólo compuesto sea responsable de la desnaturalización proteica que tiene lugar *in situ*. Así, la pérdida de OTMA debido a su degradación a DMA y FA puede incrementar por sí misma la susceptibilidad de las proteínas a la desnaturalización (Rodger y Hastings, 1984; Owusu-Ansah y Hultin, 1986; Sikorski y Kolakowska, 1994). Comparando los datos de extractabilidad de proteínas e incremento de dureza de músculo con la formación de FA (medido a través de la formación de DMA) en especies del orden gadiformes, no se encuentra una relación directa causa-efecto (Castell y col., 1973; Shenouda, 1980; Hultin, 1992 a). Por tanto, a pesar de los muchos estudios realizados en el campo de la acción del FA sobre las proteínas, su papel en los fenómenos de desnaturalización y agregación aún no está completamente aclarado.

### 1.3.2.3.- Lípidos y sus productos de degradación

El efecto de los lípidos en las proteínas durante el almacenamiento en congelación varía de acuerdo con el estado de los mismos. Los lípidos intactos (no hidrolizados ni oxidados) y los ácidos grasos libres difiere en su acción de los productos de la hidrólisis de los lípidos.

Dyer y Dingle (1961) encontraron que las especies magras de pescado, con un contenido en lípidos inferior al 1% eran menos estables y mostraban una disminución bastante rápida en extractabilidad de proteína cuando se las comparaba con las especies de pescado grasas (3-10% de lípidos). Esto les llevó a concluir que los lípidos neutros en concentraciones moderadas ejercían una acción protectora o bien incrementaban la resistencia a la desnaturalización y agregación durante la conservación por congelación. Posteriores trabajos apoyaron dicha hipótesis (Karel, 1973, Fretheim y col., 1986).

Se cree que los lípidos neutros son capaces de contrarrestar la acción negativa de los ácidos grasos libres neutralizando o disminuyendo su interacción con las proteínas. Sin embargo, también se ha encontrado que la presencia de lípidos neutros puede producir un

efecto contrario al anterior. Esto tiene lugar cuando se produce rotura de membranas celulares y de orgánulos que dan lugar a que los lípidos y proteínas se descompartimenten, de manera que pueden tener lugar nuevas formas de interacción entre ellos formando complejos lipoproteicos distintos a los naturalmente presentes y que condicionan la textura del tejido muscular (Shenouda, 1980).

Careche y Tejada (1991) no encontraron efecto alguno de los lípidos neutros sobre las propiedades funcionales de la AMN aislada de merluza durante la conservación en congelación. A pesar de esto, dichas autoras detectaron la formación de complejos lipoproteicos insolubles, lo cual coincide con lo observado por Shenouda y Piggot (1977). En la formación de estos agregados estarían implicadas las fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas (Andou y col, 1981; Careche y Tejada, 1991).

Los ácidos grasos libres se forman a partir de la hidrólisis de los lípidos en pescado durante su conservación en congelación por medio de la acción enzimática de las fosfolipasas. Estos provocan la precipitación de las proteínas en sistemas modelo, siendo los más insaturados y de cadena más corta los más efectivos (King y col. 1962; Jarenback y Liljemark, 1975). La interacción entre estos y las proteínas se cree que es de naturaleza secundaria y electrostática (Shenouda, 1980), aunque hay cierta participación de uniones covalentes (Careche y Tejada, 1994).

Durante la conservación en congelación los lípidos pueden oxidarse, dando lugar a la formación de radicales libres. Estos últimos se descomponen en peróxidos, los cuales originan más radicales libres y compuestos tales como aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos etc. Los mecanismos por los que transcurren estas reacciones y los factores que los condicionan han sido revisados por distintos autores (Jiménez-Colmenero, 1979; Lillard, 1987; Kanner y col., 1987; Gray y Pearson, 1987; Careche y Jiménez-Colmenero, 1988). Los radicales libres y productos de la oxidación interaccionan con las proteínas y producen la agregación de las mismas (Castell, 1971; Shenouda, 1980; Khayat y Schwall, 1983, Careche y Tejada, 1990 a y b). Los productos formados en la interacción proteína-lípidos oxidados son muy numerosos al ser mucha la variedad de grupos reactivos presentes en ambos tipos de compuestos. Se cree que estos se unen covalentemente a grupos especialmente susceptibles de las proteínas (grupos

-SH de la cisteína, grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina, grupos N-amino terminales del ácido aspárico, tirosina, metionina y arginina) (Shenouda, 1980). Sin embargo, Careche y Tejada (1990 a y b) encontraron un efecto protector de la funcionalidad cuando se adicionaban lípidos oxidados a músculo picado de merluza previamente a su conservación en congelación. Dichas autoras observaron menores niveles de FA en los lotes con lípidos oxidados añadidos y concluyeron que la acción protectora de los mismos podía deberse a que estos creaban un ambiente rico en oxígeno que producía inhibición de la degradación enzimática del OTMA y por tanto, de la formación de FA.

#### **1.3.2.4.- Interacción entre las distintas causas de las alteraciones**

Todos los factores discutidos anteriormente tienen efecto directa o indirectamente sobre la agregación, ya que cada uno puede influir sobre los otros factores. Por ejemplo, la elevada concentración salina pueden estimular la degradación de los lípidos y acelerar la liberación de ácidos grasos libres (Shenouda, 1980). Por otro lado, la ruptura de las membranas celulares debido a la formación de cristales de hielo puede dar lugar a la liberación de los lípidos de membrana y así aumentar la probabilidad de reacción con proteínas, dando lugar a la formación de complejos lipoproteicos no presentes de forma natural en los tejidos. La depleción de OTMA, debido a la acción de la OTMA-desmetilasa, acelera de manera indirecta la autooxidación de los lípidos (Shenouda, 1980). Además, el OTMA tiene la capacidad de actuar como un osmolito protector que contrarresta el efecto de desnaturalización proteica debido al incremento de la concentración de sales (Hultin, 1992 b). También, la presencia de lípidos oxidados inhibe la formación de FA (Careche y Tejada, 1990 a y b). Sin embargo, la mayoría de estas interacciones no han sido estudiadas en profundidad y existen pocas conclusiones claras respecto a su influencia en el proceso de desnaturalización y agregación durante la conservación en congelación.

### **1.3.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD DE DESNATURALIZACION DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES DURANTE LA CONGELACION Y CONSERVACION EN CONGELACION**

Los distintos factores se pueden agrupar en: intrínsecos (especie y estacionalidad), de procesado y factores relativos a la congelación y conservación en estado congelado (velocidad de congelación, temperatura y tiempo de conservación).

#### **1.3.3.1.- Especie y estacionalidad**

Las especies con relativamente alto contenido en grasa tienden a ser menos susceptibles a los cambios en textura por conservación en congelación. Esto se ha atribuido al efecto protector de los lípidos discutido en el apartado 1.3.3.3..

También se ha demostrado que las especies del orden gadiformes (merluza, bacalao, bacaladilla, etc..) son más susceptibles a la desnaturalización proteica durante la conservación, lo cual, como se ha indicado en el apartado 1.3.3.2., se ha atribuido a la acción del FA producido en estas especies en mayor cantidad.

La estabilidad del músculo de pescado durante el almacenamiento por congelación varía también con la estación del año y otras características biológicas como estado nutricional, grado de fatiga o estadio del ciclo reproductivo (Dagbjartsson, 1975; Crupkin y col., 1982, 1988; Simpson y Haard, 1987; Silva-Pacheco, 1987; Love, 1988).

#### **1.3.3.2.- Velocidad de congelación**

Este factor influye en los fenómenos de cristalización y difusión del agua tisular, los cuales son causa importante de desnaturalización de la proteína miofibrilar, como ya se ha indicado.

Si la velocidad de congelación es rápida predomina la cristalización intracelular, formándose cristales pequeños que apenas modifican la estructura celular. Sin embargo, si la velocidad de congelación es lenta se forman cristales extracelulares grandes debido a que los primeros núcleos de cristalización se forman extracelularmente. Esto provoca la formación de cristales extracelulares hacia los cuales tiene lugar una difusión de agua desde el interior de la célula (Matsumoto, 1979; IIF, 1990; Tejada, 1995).

Además, la velocidad de congelación determina también el tiempo durante el cual el músculo está expuesto a temperaturas en el rango entre  $-1$  y  $-5^{\circ}\text{C}$  (llamado zona de estabilidad invertida), donde tienen lugar muchas reacciones catabólicas de manera más rápida que en fresco debido al efecto de crioconcentración (IIF, 1990).

#### **1.3.3.3.- Temperatura y tiempo de conservación**

Como quedó demostrado en los trabajos de Dyer (Dyer 1951; Dyer y Morton, 1956; Dyer y col., 1956) y Connell (1960 a y b), mientras menor es la temperatura de conservación en congelación, menor es la velocidad de desnaturalización proteica. También se sabe que durante el tiempo de almacenamiento en congelación tiene lugar un crecimiento de los cristales de hielo y una desnaturalización progresiva de las proteínas del tejido muscular (Tanaka, 1965; Love, 1966, Matsumoto, 1979; IIF, 1990).

La dependencia con respecto a la temperatura de los distintos procesos relacionados con el deterioro no es la misma. Así, la energía de activación de Arrhenius ( $E_a$ ) de los cambios en textura es mayor que la de los cambios bioquímicos (LeBlanc y col. 1988, Haard, 1990). Además, esta dependencia con respecto a la temperatura depende a su vez de la especie (Swetja, 1990).

#### **1.3.3.4.- Procesamiento del músculo**

El tratamiento al que se somete el músculo tiene gran influencia en su comportamiento

#### 1.4.- NATURALEZA DEL PROCESO DE DESNATURALIZACION Y AGREGACION DURANTE LA CONSERVACION EN CONGELACION

Los fenómenos de desnaturalización no solo tienen lugar en las proteínas miofibrilares, o del estroma, la mayoría de las proteínas enzimáticas de las células musculares muestran disminución de su actividad a lo largo del tiempo de conservación (Sikorski y Kolakowska, 1994; Mackie, 1993). En general todos los constituyentes del músculo están afectados en mayor o menor grado por la conservación en congelación, aunque los mayores cambios se dan en proteínas miofibrilares, sobre todo en miosina (Mackie, 1993). El mecanismo por el que tienen lugar estos cambios en proteínas miofibrilares se ha estudiado desde el punto de vista morfológico (mediante microscopía electrónica, fundamentalmente) y bioquímico.

En cuanto al mecanismo de agregación desde el punto de vista morfológico, la primera hipótesis acerca del mismo se debe a King (1966). Dicho autor, por medio de estudios de ultracentrifugación sugirió que durante el almacenamiento de músculo de bacalao había una rápida disociación de la actomiosina F (actomiosina filamentosa) en actomiosina G (actomiosina globular) seguida de una disociación de la actomiosina G en sus componentes (miosina y actina F y actina G), los cuales se agregan entonces constituyendo la proteína inextractable en solución salina. King (1966) indicó también la posibilidad de agregación de las macromoléculas de actomiosina F.

Estudios morfológicos más recientes, utilizando la microscopía electrónica, han sido revisados por Matsumoto (1980). En base a ellos, dicho autor propuso que en los primeros estadios de la conservación en congelación, los filamentos de actomiosina se presentan agregados lateralmente y entrecruzados y que este entrecruzamiento y agregación se acentúa hasta dar origen a estructuras en forma de red. Además del entrecruzamiento y agregación de la actomiosina, durante la congelación y conservación en congelación tiene lugar una disociación de la misma en actina F y miosina acompañada de una agregación de ambas proteínas.

Las distintas aportaciones a la dilucidación de mecanismo bioquímico de la agregación de las proteínas miofibrilares durante la congelación y conservación han sido recogidas en el



apartado 1.3.1. En general, se admite que en este intervienen las reacciones de las proteínas con los lípidos y sus productos de degradación (ácidos grasos, productos de la oxidación) y con el FA formado por la degradación del OTMA. Por otro lado, los cambios en la concentración salina y la deshidratación de las moléculas proteicas que se producen al congelarse el agua tisular conducen a alteraciones en la conformación nativa de las proteínas favoreciendo la formación de nuevas uniones electrostáticas y secundarias inter e interproteicas. Los distintos trabajos de solubilidad y extractabilidad realizados hasta ahora parecen indicar que los enlaces que intervienen en la desnaturalización y agregación son de tipo secundario, S-S y covalente no S-S (apartado 1.3.1.1.). También se sabe que las proteínas más afectadas son la miosina y actina, mientras que la tropomiosina es la más estable (Matsumoto, 1979; Mackie, 1993; Sikorski y Kolakowska, 1994).

Hultin (1992 a y b) ha sugerido recientemente un posible mecanismo bioquímico de desnaturalización y agregación de la miosina durante la conservación en congelación, desde el punto de vista de la acción del FA. Según este autor, el FA reacciona con la miosina, desestabilizándola y haciéndola más susceptible a la desnaturalización bajo las condiciones de estrés inducidas durante la congelación y conservación en congelación. Sin embargo, no existe evidencia directa que confirme ninguna de las hipótesis propuestas acerca de la acción específica de los distintos factores sobre la agregación *in situ*. Esto es debido a la complejidad de reacciones químicas y enzimáticas que pueden afectar a la proteína miofibrilar cuando esta se encuentra integrada en la estructura del músculo.

En vista de lo anteriormente indicado, la evidencia presentada hasta ahora es insuficiente para poder confirmar cualquier hipótesis sobre naturaleza del proceso de desnaturalización y agregación de las proteínas durante el almacenamiento en congelación del músculo. La gran cantidad de factores que han sido relacionados en mayor o menor medida con dicho proceso pone de manifiesto la incertidumbre existente y sugiere la necesidad de más trabajo experimental *in situ* y en sistema modelo para poder esclarecerlo.

## **OBJETIVOS Y DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS**

## 2.- OBJETIVOS Y DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS

Como ya se ha indicado en la introducción del presente trabajo, el consumo de pescado en nuestro país es uno de los mayores en el mundo. La congelación es uno de los métodos de conservación más utilizados en pescados magros y es el origen de un sector de gran importancia económica. Sin embargo, durante el almacenamiento en congelación, los pescados magros sufren una serie de modificaciones en la textura y funcionalidad que, según la especie son más o menos evidentes. Estos cambios están asociados con fenómenos de desnaturalización y agregación de proteínas miofibrilares fundamentalmente y se aceleran cuando el músculo se somete a picado previamente a la congelación. Debido a ello, desde hace décadas se ha venido estudiando el fenómeno de desnaturalización y agregación de las proteínas miofibrilares en pescado almacenado en congelación. En estos trabajos se han estudiado los cambios en extractabilidad de la actomiosina natural (AMN) en soluciones salinas y en diferentes agentes capaces de romper enlaces secundarios y puentes disulfuro. Otras aproximaciones al estudio de la desnaturalización y agregación se han centrado más en los cambios bioquímicos que ocurren en las proteínas miofibrilares extraídas en soluciones salinas. Estos trabajos han sido recogidos por diversos autores en diversas revisiones (Haard, 1990; Hultin, 1992 b; Mackie, 1993 y Sikorski y Kolakowska, 1994). También se ha estudiado el fenómeno desde el punto de vista morfológico, utilizando técnicas de microscopía electrónica (revisión de Matsumoto, 1980) y cromatografía de gel filtración (Umemoto y col., 1971; Seki y Arai, 1974; Ohashi y Rodger, 1979). Sin embargo, la diferente metodología, especies y condiciones de procesado y conservación empleadas hace que exista una cierta confusión en cuanto a la interpretación de los resultados obtenidos por los distintos autores. Es pues necesario realizar estudios en distintas especies, siguiendo una misma metodología y que comprendan el mayor número posible de aproximaciones. De esta forma se puede obtener una visión más completa del fenómeno de desnaturalización y agregación de las proteínas miofibrilares durante la conservación en congelación.

Se han seleccionado para el presente estudio tres especies: bacalao, merluza y bacaladilla. El bacalao se eligió por su gran importancia industrial y porque su consumo

mundial es el mayor entre las especies del género gádiformes (FAO, 1995). Esta especie pertenece al grupo de los pescados magros, los cuales dominan el mercado pesquero internacional. Debido a ello, su comportamiento durante la conservación en congelación ha sido ampliamente estudiado (Mackie, 1993). La merluza y la bacaladilla son dos especies de importante consumo en nuestro país. En las tablas 3.1 a 3.3 se exponen los datos referentes a las capturas realizadas por la flota pesquera española y mundial de las tres especies entre los años 1984 y 1993. En ellas se puede observar como las capturas de merluza realizadas por la flota pesquera española entre 1984 y 1993 supusieron un porcentaje importante de las capturas a nivel mundial. Los datos referentes al volumen de pesca de bacaladilla realizados por la flota española fueron similares a los de merluza, aunque supusieron un porcentaje menor que el de merluza respecto a las capturas mundiales en el periodo considerado. La pesca de bacalao ha ido decreciendo en nuestro país desde 1984, aunque las capturas mundiales fueron mucho mayores que las de merluza y bacaladilla entre 1984 y 1993.

CAPTURAS DE BACALAO POR LA FLOTA DE ESPAÑA					
AÑO	1984	1985	1986	1987	1988
Tm	26493	29234	49628	31129	33459
AÑO	1989	1990	1991	1992	1993
Tm	30261	14547	13757	9965	6055
CAPTURAS MUNDIALES DE BACALAO					
AÑO	1984	1985	1986	1987	1988
Tm	2.000.016	1.960.054	2.037.611	2.069.542	1.955.681
AÑO	1989	1990	1991	1992	1993
Tm	1.774.926	1.493.926	1.344.246	1.174.624	1.134.147

Tab 2.1.- Capturas (Tm) en España y mundiales de bacalao (*Gadus morhua*) entre 1984 y 1993. Datos de la FAO (1995)

CAPTURAS DE MERLUZA POR LA FLOTA DE ESPAÑA					
AÑO	1984	1985	1986	1987	1988
Tm	45.397	35.640	33.370	33.495	31.629
AÑO	1989	1990	1991	1992	1993
Tm	31.629	35.590	32.758	36.500	50.865
CAPTURAS MUNDIALES DE MERLUZA					
AÑO	1984	1985	1986	1987	1988
Tm	128.831	134.810	122.151	125.465	124.838
AÑO	1989	1990	1991	1992	1993
Tm	118.881	115.577	117.932	139.611	142.558

Tab 2.2.- Capturas (Tm) en España y mundiales de merluza (*Merluccius merluccius* L) entre 1984 y 1993. Datos de la FAO (1995)

CAPTURAS DE BACALADILLA POR LA FLOTA DE ESPAÑA					
AÑO	1984	1985	1986	1987	1988
Tm	16.070	19.959	29.397	29.984	33.837
AÑO	1989	1990	1991	1992	1993
Tm	33.837	38.074	35.044	38.000	42.000
CAPTURAS MUNDIALES DE BACALADILLA					
AÑO	1984	1985	1986	1987	1988
Tm	613.873	669.290	817.987	711.554	671.636
AÑO	1989	1990	1991	1992	1993
Tm	664.845	585.750	444.367	480.868	555.928

Tab 2.3.- Capturas (Tm) en España y mundiales de bacaladilla (*Micromesistius pouassou*) entre 1984 y 1993. Datos de la FAO (1995)

Las tres especies estudiadas pertenecen al orden gádidos y son formadoras de DMA y FA, por lo que los cambios en textura debidos a la alteración de las proteínas miofibrilares durante la conservación en congelación representan un importante factor relativo a la pérdida de calidad.

Desde el punto de vista tecnológico, el conocimiento de la agregación de las proteínas miofibrilares del músculo permitirá definir los métodos o condiciones más adecuadas para la conservación del pescado en función de la especie y del procesado. Asimismo, establecería las bases para el diseño protocolos de refuncionalización de partidas de pescado cuya funcionalidad se ha visto reducida durante la conservación en congelación. Estos tratamientos permitirían utilizar estas partidas de pescado en procesos industriales. Además, con este conocimiento podría mejorarse la legislación acerca del control de calidad de pescado congelado, ya que consideramos que esta no es lo suficientemente precisa y no es capaz de diferenciar distintos grados de alteración de la proteínas miofibrilares.

## **2.1.- OBJETIVOS**

El presente trabajo tuvo como objetivo fundamental el estudio de la desnaturalización y agregación proteica durante la conservación en congelación, prestando especial interés al estudio de los tipos de enlaces y proteínas implicadas en esta agregación.

Dentro de este objetivo fundamental, se propusieron como objetivos parciales el estudio de la influencia de:

- especie de pescado
- grado de integridad del músculo
- cantidad de FA formado

## 2.2.- DISEÑO DEL TRABAJO

Para alcanzar los objetivos anteriores se diseñaron dos tipos de estudios

- En músculo conservado en congelación (*in situ*)
- En sistema modelo de proteína aislada y conservada en congelación

### Experimentos *in situ*

Inicialmente se realizaron estudios en músculo picado y filetes de bacalao (*Gadus morhua*, L) durante un período de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  de 62 semanas. Posteriormente se estudió el comportamiento de músculo picado conservado en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 49 semanas en otras dos especies: merluza (*Merluccius merluccius*, L) y bacaladilla (*Micromesistius pontassou*, R). El diseño del trabajo fue similar en los dos estudios.

Se midieron parámetros funcionales (viscosidad aparente, medida instrumental de textura con la célula de Kramer y proteína soluble) y bioquímicos (determinación de DMA y FA libre) en músculo de forma periódica. La funcionalidad de músculo tiene interés desde el punto de vista tecnológico y está relacionada fundamentalmente con los cambios a nivel de las proteínas miofibrilares. Los parámetros bioquímicos (DMA y FA) fueron determinados dada la importancia que se da al FA en las alteraciones de las proteínas miofibrilares durante la conservación en congelación, cuyo estudio es el objeto principal de este trabajo.

De forma paralela a las medidas realizadas en músculo, en cada uno de los controles se aisló la AMN en NaCl 0,6 M. En esta fracción se midieron diversos parámetros: actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica, hidrofobicidad superficial alifática (CPA) y aromática (ANS), viscosidad aparente e índice de actividad de emulsión (IAE). Estas medidas se consideran indicativas de las alteraciones bioquímicas y funcionales de la AMN durante la conservación. También se analizó la AMN extraída en cada control por electroforesis (SDS-PAGE) y cromatografía de

gel-filtración. Las electroforesis nos dan información acerca de los posibles cambios en composición de los extractos salinos y permiten detectar la presencia de agregados covalentes en los mismos. Mediante el análisis por cromatografía de gel-filtración se pueden detectar agregados solubles formados por enlaces secundarios. Estos cambios no se observan por electroforesis debido a las condiciones desnaturalizantes empleadas en estas.

El agregado no extraído en NaCl 0,6 M se trató con SDS 2%, obteniéndose una fracción de proteína extraída (S2) y un precipitado (P2) que se trató a su vez con SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% para obtener una nueva fracción de proteína extraída (S3) y un agregado inextractable (P3) que se consideró formado por enlaces covalentes no S-S fundamentalmente. Las distintas fracciones obtenidas se analizaron por electroforesis (SDS-PAGE). Este tratamiento estuvo encaminado a estudiar la naturaleza de los enlaces que participan en la agregación y la evolución de los mismos a lo largo del tiempo. Las electroforesis permitieron conocer la implicación de las distintas proteínas miofibrilares en dicha agregación así como la presencia de agregados covalentes en las fracciones extraídas.

### **Experimentos en sistema modelo de AMN aislada**

Para estudiar el efecto del FA en la congelación y conservación en congelación sobre la AMN aislada se prepararon dos sistemas modelo con AMN aislada de músculo de bacalao, merluza y bacaladilla. En el primero de ellos (SM1) se pretendía estudiar la solubilidad en solución salina de la proteína en presencia o no de distintas cantidades de FA. De los resultados de este sistema modelo se pudo seleccionar la cantidad de FA que se añadió a la AMN en el siguiente sistema modelo, cuyo objeto era el estudio de la extractabilidad en distintos agentes de los agregados insolubles (SM2).

El SM1 se realizó en dos etapas, en la primera se estudió sólo una especie: merluza (SM1 a), posteriormente se estudiaron las otras dos especies: bacalao y bacaladilla (SM1b). A la vista de los resultados obtenidos en SM1 a, en el SM1 b se modificó ligeramente la metodología mediante la introducción de un lavado de la proteína insoluble en el protocolo



de determinación de la solubilidad. También se decidió utilizar otro método de determinación de la concentración proteica (apartado 3.2.5.2.) más adecuado para las determinaciones que habría que realizar posteriormente en SM2. En este sistema modelo se estudió el efecto de distintas concentraciones de FA sobre la solubilidad en NaCl 0,6 M de la AMN, tanto en fresco como durante la congelación y conservación en congelación. Para observar la acción del FA sobre la AMN previamente desnaturalizada por congelación y conservación en congelación, se añadió cierta cantidad de este a la AMN descongelada en cada control, determinándose el efecto sobre la solubilidad en NaCl 0,6 M.

Como ya se ha indicado, el SM2 se diseñó para determinar la extractabilidad de los agregados obtenidos en cada control en distintos agentes. Con ello se pudo estudiar los cambios en la participación de los distintos tipos de enlaces y proteínas en la agregación de la AMN aislada durante la conservación en congelación. Además, el SM2 permitió estudiar la acción del FA sobre la naturaleza de la agregación y sus cambios a lo largo de la conservación. Este estudio se llevó a cabo en AMN aislada de bacalao, merluza y bacaladilla. Se utilizó una relación proteína/FA adecuada para obtener cantidad de agregado suficiente para poder estudiar su extractabilidad en distintos agentes siguiendo un protocolo similar al empleado en los estudios *in situ*. Al igual que en dichos estudios, y con el mismo objetivo, se realizaron electroforesis (SDS-PAGE) de todas las fracciones de proteína extraída.

## **MATERIALES Y METODOS**

### 3.- MATERIALES Y METODOS

#### 3.1.- MATERIALES

##### 3.1.1.- ESPECIES ESTUDIADAS

Las especies estudiadas en este trabajo fueron: bacalao (*Gadus morhua*, L), merluza (*Merluccius merluccius*, L) y bacaladilla (*Micromesistius poutassou*, R).

El músculo picado y los filetes de bacalao fueron suministrados por Torry Research Station, Aberdeen, Reino Unido en Octubre de 1992. Estos lotes se prepararon y fueron posteriormente congelados y envasados a vacío en dicho centro. Posteriormente fueron enviados al Instituto del Frío por avión en cajas de poliestireno con CO<sub>2</sub> sólido. En el laboratorio fueron almacenados en cámaras a -20°C.

Los lotes de músculo picado de merluza y bacaladilla se prepararon en nuestra planta piloto del Instituto del Frío a partir de pescados enteros en estado de postrigor que fueron capturados en Marzo de 1994 y transportados a nuestro laboratorio con hielo en cajas de poliestireno expandido. Estas muestras fueron capturadas 24 horas antes de su llegada a nuestro laboratorio. El peso total de las muestras fue de 18,092 Kg (merluza) y 9,025 Kg (bacaladilla). La longitud media de los individuos fue de  $81,7 \pm 1,7$  en el caso de la merluza y  $29,28 \pm 2,7$  cm en el caso de la bacaladilla y el peso medio de los mismos fue de  $2 \pm 0,5$  Kg en la merluza y de  $190 \pm 40$  g en la bacaladilla.

##### 3.1.2.- REACTIVOS

La mayoría de los reactivos utilizados se obtuvieron de las casas comerciales Merck (Alemania), Panreac (España) y Probus (España) con excepción de los relacionados

posteriormente.

Los tampones, geles y patrones para electroforesis se obtuvieron de Pharmacia Biotech (Suecia). El relleno de la columna de cromatografía de filtración en gel se obtuvo de Bio-Rad Laboratories, S.A. (España). Los patrones de filtración en gel fueron adquiridos de Pharmacia Biotech (Suecia). El ácido cis-parinárico se obtuvo de Molecular Probes Inc. (EEUU). La sal sódica del ácido 8-anilino 1-naftalén sulfónico fue de la casa Sigma (EEUU). El fluoruro de fenil metil sulfónico (PMSF) fue de Sigma (EEUU).

Las bolsas empleadas para envasar a vacío fueron de Criovac BB-1, con una permeabilidad al oxígeno de  $6 \text{ cm}^3/24 \text{ h/m}^2/\text{at.}$  a  $23^\circ\text{C}$ . Las membranas de diálisis utilizadas fueron tubos de diálisis-visking número 6, con tamaño de poro de 24 y con un diámetro hinchado de 21,5 mm (Medicall International LTD, EEUU).

### 3.1.3.- MEDIOS INSTRUMENTALES

El picado de los músculos de merluza y bacaladilla se ha realizado en una extrusora Baader modelo 694 (Alemania), con un diámetro de orificio de tambor de 3 mm.

La congelación de las muestras se ha llevado a cabo en armario de placas horizontales, Saubre, modelo "Benjamín" (Hanst-Moller), (Alemania).

La cámara fría donde se realizaron los experimentos a temperatura a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  fue de la marca Ako-Electrónica, (España).

El almacenamiento en estado congelado se ha realizado en cámaras frigoríficas Polymar e Industrias J-M (España) con una temperatura de  $-20 \pm 1^\circ\text{C}$  y un arcón horizontal de congelación a temperatura de  $-20^\circ\text{C}$  marca Zannussi-420, (España). Para la conservación de las muestras de electroforesis se utilizó un arcón de  $-80^\circ\text{C}$ , modelo Hetofrig CL410, marca Heto (Suecia).

La cortadora mecánica utilizada para los bloques de pescado es un modelo F2, marca Braher (Nordischer, Mas), (Alemania).

La envasadora a vacío utilizada es de la marca Electromecánica Urbano, (España).

Las centrifugaciones se han llevado a cabo en centrífugas de las siguientes marcas y modelos: Sorvall RT 6000B, Sorvall RC-5B y Sorvall Microspin 24S de Dupont Co., (EEUU).

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro marca Hitachi modelo 100-40 y en un espectro UV/VIS modelo Lambda 15 de Perkin-Elmer (EEUU).

Las homogeneizaciones se realizaron en un homogeneizador Sorvall Omni-Mixer modelo 17.106 con vasos de acero inoxidable (EEUU).

Las medidas fluorimétricas se realizaron en un fluorímetro Hitachi modelo F-2000 (Japón).

Para las medidas de nitrógeno se ha utilizado un digestor modelo Büchi 425 y destilador modelo Büchi 425, ambos marca Büchi (Suiza).

Las medidas de viscosidad se han llevado a cabo en un viscosímetro rotatorio Brookfield modelo LVTD, MAB Industrial (Reino Unido).

Las medidas de textura han sido determinadas en un texturómetro universal Instron modelo 4501 (EEUU), adaptándole la célula de Kramer (Kramer y col., 1951).

Las medidas por cromatografía de gases se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases modelo 8.500 de Perkin Elmer (EEUU). Este se equipó con una columna de vidrio (1,75 m x 2 mm d.i.) de Supelco, Inc. (EEUU) y un detector de ionización de llama (FID) de Perkin Elmer (EEUU).

Las electroforesis fueron realizadas en un sistema Phastsystem de Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala (Suecia). Los geles se analizaron en un analizador de imagen modelo 3CX de Millipore Co. (EEUU) y un escaner modelo 3cx de Microtek Scanners. K & M Company (EEUU).

La cromatografía de gel filtración se realizó en un cromatógrafo de líquidos (FPLC: fast performance liquid chromatography). Este se equipó con un controlador modelo LCC-501 Plus, una válvula V-7, un inyector de muestra de 10 mL, un monitor de ultravioleta modelo UV-1, un colector de fracciones modelo FRAC-100, un registro modelo REC 102 y una columna de 55 cm de longitud y 2,5 cm de diámetro. Todo ello de Pharmacia Biotech (Suecia).

Para el estudio de la ultraestructura de las fracciones solubles por microscopía electrónica se utilizó un microscopio electrónico Zeiss (Carl Zeiss, Alemania) modelo 902.

### **3.2.- METODOLOGIA EMPLEADA**

#### **3.2.1.- PREPARACION DEL MUSCULO PICADO**

Tras descabezar y eviscerar la muestra, esta se lavó con agua con hielo para eliminar restos de sangre, etc.. La merluza fue fileteada antes de introducirla en la extrusora. El músculo se extrajo con una extrusora Baader, quedando de esta manera el músculo picado libre de piel y espinas. El rendimiento en músculo picado por 100 g de muestra fue del 66% para la merluza y 47% para la bacaladilla.

Una vez picado el músculo se depositó en bandejas de 3,5 cm de altura con capacidad para aproximadamente 600 g de pasta cada una que fueron inmediatamente congeladas en un armario de placas horizontales, dándose por terminado el proceso de congelación cuando el centro térmico alcanzó una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . La congelación duró de 3 a 4 horas según

los lotes.

Una vez congelados los bloques de músculo picado, se cortaron mediante una cortadora mecánica en porciones más o menos grandes en función de la cantidad requerida para efectuar cada análisis periódico; se etiquetaron adecuadamente y se envasaron a vacío en bolsas Criovac BB-1, obteniéndose en el interior de la bolsa una presión de 80 Torr.

Las muestras congeladas y envasadas a vacío se almacenaron en cámara frigorífica a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.2.- ANALISIS ELEMENTALES Y pH**

En los lotes de músculo picado y filetes se analizó por triplicado el contenido en proteína bruta, grasa bruta, humedad, cenizas y pH.

#### **3.2.2.1.- Proteína bruta**

Se utilizó el método Kjeldahl, siguiendo el método oficial de la AOAC (1984). El porcentaje de proteína bruta se calculó a partir del porcentaje de nitrógeno total, utilizando el factor de conversión 6,25 (Lillevik, 1970). Los resultados se expresan en gramos de proteína por 100 g de músculo.

#### **3.2.2.2.- Grasa bruta**

Se determinó por el método de Bligh y Dyer (1959) modificado por Knudsen y col. (1984). Este método se considera de elección para determinar niveles bajos de grasa en músculo. Los resultados se expresan en gramos de grasa por 100 g de músculo.

### **3.2.2.3.- Humedad**

Se siguió el método recomendado por la AOAC (1984), expresándose el resultado en gramos de agua por 100 gramos de músculo.

### **3.2.2.4.- Cenizas**

Se determinaron según el método recomendado por la AOAC (1975). Los resultados se expresan en gramos de cenizas por 100 g de músculo.

### **3.2.2.5.- pH**

Se determinó según la técnica recomendada por Vyncke (1981). Las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

## **3.2.3.- ANALISIS DE CONTROL DE CALIDAD DEL MUSCULO**

### **3.2.3.1.- Solubilidad proteica (SOL/TOT)**

La técnica utilizada es la descrita por Ironside y Love (1958). Una vez separadas la proteína soluble e insoluble, se determinó la cantidad de nitrógeno por el método de Kjeldahl, indicado en el apartado 3.2.2.1., utilizando el mismo factor de conversión. Los resultados se expresan en porcentaje de proteína soluble respecto a proteína total.



### 3.2.3.2.- Viscosidad aparente de músculo ( $\eta_{ap}$ )

Esta propiedad funcional se determinó según la técnica descrita por Borderías y col. (1985 a). De acuerdo con dichos autores, se homogeneizó el músculo tras añadir a este una solución al 5% de NaCl en relación 1:4 (p:v). Posteriormente se filtró el homogeneizado pasándolo a través de una malla. La medida se realizó sobre este filtrado, tras ajustar el pH a 7. Se utilizó un viscosímetro rotatorio Brookfield modelo LV, empleando una velocidad de 12 rpm y realizando lecturas cada tres minutos. Todas las operaciones se llevaron a cabo entre 0 y 4°C. Los valores obtenidos se expresan en centipoises (cP).

### 3.2.3.3.- Dimetilamina (DMA)

La extracción de la DMA se realizó mediante la homogeneización en Omimixer (1 minuto en posición 4) de 20g de músculo al que previamente se le habían añadido 60 mL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 6%. Posteriormente se filtró el homogeneizado utilizando papel de filtro Whatman nº 1 y se recogió el extracto y se midió el volumen del mismo. A 1 mL de este extracto se le añadió 1 mL de benceno y 1 mL de KOH al 65% (p/v). Se calentaron los tubos a 60°C durante 10 minutos y se agitaron en agitador de tubos durante 2 minutos. Se añadieron 45,8 µL de una solución de n-propilamina en TCA al 6% (1/20 v/v) como patrón interno.

La DMA se cuantificó por cromatografía de gases, utilizando una modificación de los métodos propuestos por Lundstron y Racicot (1983) y Pérez Martín y col. (1987). La columna (apartado 3.1.3.) se empaquetó con 25 cm de una malla 80-100 de chromosorb 103 sin tratar y 150 cm de una mezcla de 4% carbomax 20M y 0,8% KOH soporte carbopack B. Esta se acondicionó siguiendo las recomendaciones de Supelco Inc. (1971). Las condiciones operativas fueron: temperatura inicial 115°C; temperatura final 200°C; incremento de temperatura 30°C/min; mantenimiento de la temperatura inicial 5 minutos; mantenimiento de la temperatura final 12 minutos; temperatura del inyector y el detector 250°C; flujo de nitrógeno 25 mL/min; sensibilidad del FID  $10^{-10}$ ; tamaño de la muestra 2 µL. Los compuestos se identificaron en función de la coincidencia de los tiempos de retención de los picos con el

patrón DMA.

### 3.2.3.4.- Formaldehído (FA)

Se utilizó el método descrito por Castell y Smith (1973). La reacción colorimétrica de Nash (1953) se llevo a cabo sobre el extracto acuoso obtenido al arrastrar por corriente de vapor el formaldehído liberado del músculo por calentamiento en presencia de ácido fosfórico. Los resultados se expresan en  $\mu\text{moles/g}$  músculo.

### 3.2.3.5.- Resistencia a la cizalladura (KRAMER)

Se determinó con un texturómetro universal Instron, adaptándole una célula de Kramer (Kramer y col., 1951). Esta célula combina extrusión, compresión y fuerza de corte. La altura máxima de la curva se considera como medida de la resistencia a la cizalladura (Touraille y Sale, 1977).

Para efectuar las medidas se descongeló el músculo, tanto filetes como picado, durante 15 horas a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ . Los filetes se picaron homogéneamente y tanto los filetes picados como el músculo picado se calentaron a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos en baño de agua en cajas metálicas cilíndricas (30 mm alto por 30 mm de diámetro) herméticamente cerradas, con un contenido aproximado de 25 g de músculo en cada una. Las muestras se enfriaron en agua con hielo durante 30 minutos, conservándose en nevera a  $5^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la medida.

Cada determinación se hizo sobre dos rodajas de 15 mm de altura realizando seis determinaciones por lote, con un cabezal que ejerce una fuerza máxima de 5 kN a una velocidad de 100 mm/min. Los resultados se expresan en N/g de músculo.

### 3.2.4.- ESTUDIO DE EXTRACTABILIDAD DE PROTEINAS MIOFIBRILARES DE MUSCULO

#### 3.2.4.1.- Extracción de actomiosina natural (AMN)

El aislamiento de AMN se realizó de acuerdo con la técnica de Kawashima y col. (1973) según se describe a continuación.

Se picó el músculo con tijeras. Cada 100g de picado se lavó con 500 mL de una solución tampón fosfato a pH 7,5 (tampón A). Esta mezcla se centrifugó a 6.500 rpm durante 15 minutos en centrífuga refrigerada a temperatura entre 0 y 5°C. El precipitado se recogió y fue sometido de nuevo a dos procesos de lavado iguales al anterior. Al músculo lavado se añadieron 300 mL de una solución de KCl 0,8M a pH 7,5 (tampón B). A continuación se homogeneizó la mezcla en un homogeneizador Omnimixer durante 3 minutos en posición 6 (este proceso se realizó en dos etapas de 1,5 minutos y con el vaso sumergido en un baño de agua con hielo). A continuación, el homogeneizado se transfirió a un vaso de precipitados y se lavó el recipiente de homogeneización con 200 mL de la misma solución para recuperar la proteína residual. Se combinaron ambos extractos, formando una mezcla que, tras ser bien agitada, permaneció en reposo durante 2 horas a 0°C en hielo. Este extracto proteico fue centrifugado a 6.500 rpm durante 20 minutos en centrífuga refrigerada entre 0 y 5°C. El sobrenadante se adicionó sobre unos 6 L de agua y hielo ( $T^a$  entre 2 y 5°C) y se dejó en reposo durante 20 minutos hasta que la proteína precipitó. La capa superior de agua se eliminó por medio de una sifonación. El resto, que contenía la proteína suspendida en agua, se centrifugó a 6.500 rpm durante 15 minutos en centrífuga refrigerada entre 0 y 5°C. Al precipitado obtenido se le añadió la cantidad necesaria de una solución de NaCl 3,0 M pH 7 (tampón C) para obtener una solución de AMN en 0,6 M NaCl que se filtró posteriormente a través de gasa de nylon. A continuación se dializó en solución de NaCl 0,6M a pH 7 (tampón D) durante 24 horas en cámara de refrigeración. De esta manera se obtuvo el extracto proteico da una concentración entre 20 y 30 mg/mL de actomiosina en NaCl 0,6 M a pH 7.

Todas las operaciones se realizaron en cámara fría a temperatura entre  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ . A

todos los tampones de extracción, diálisis y dilución se les añadió 1mM de PMSF para evitar proteolisis.

Para determinar la concentración de la proteína aislada se utilizaron los métodos de Kjeldahl, siguiendo el método indicado en el apartado 2.2.1.1. y Lowry (Lowry y col., 1951), utilizando como patrón seroalbúmina bovina (Sigma). Los resultados se expresaron en mg/mL.

La AMN extraída se diluyó hasta una concentración final de 10 mg/mL con 0,6 M NaCl pH 7 (tampón D), y en ella se realizaron las determinaciones correspondientes durante los dos días siguientes excepto en los casos de las muestras para electroforesis y cromatografía de gel filtración, que fueron sometidas al tratamiento previo correspondiente, almacenándose posteriormente a  $-80$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  respectivamente.

Para mayor claridad en la descripción de los materiales y métodos y resultados, cuando se haga mención a una solución de 0,6 M NaCl y tampón tris clorhídrico 0,05 M a pH 7, en la que se extrae la AMN, se omitirá la especificación referente al tampón y al pH utilizados.

Tampones utilizados:

**A:** Tampón fosfato:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3,38 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  15,5 mM, pH 7,5

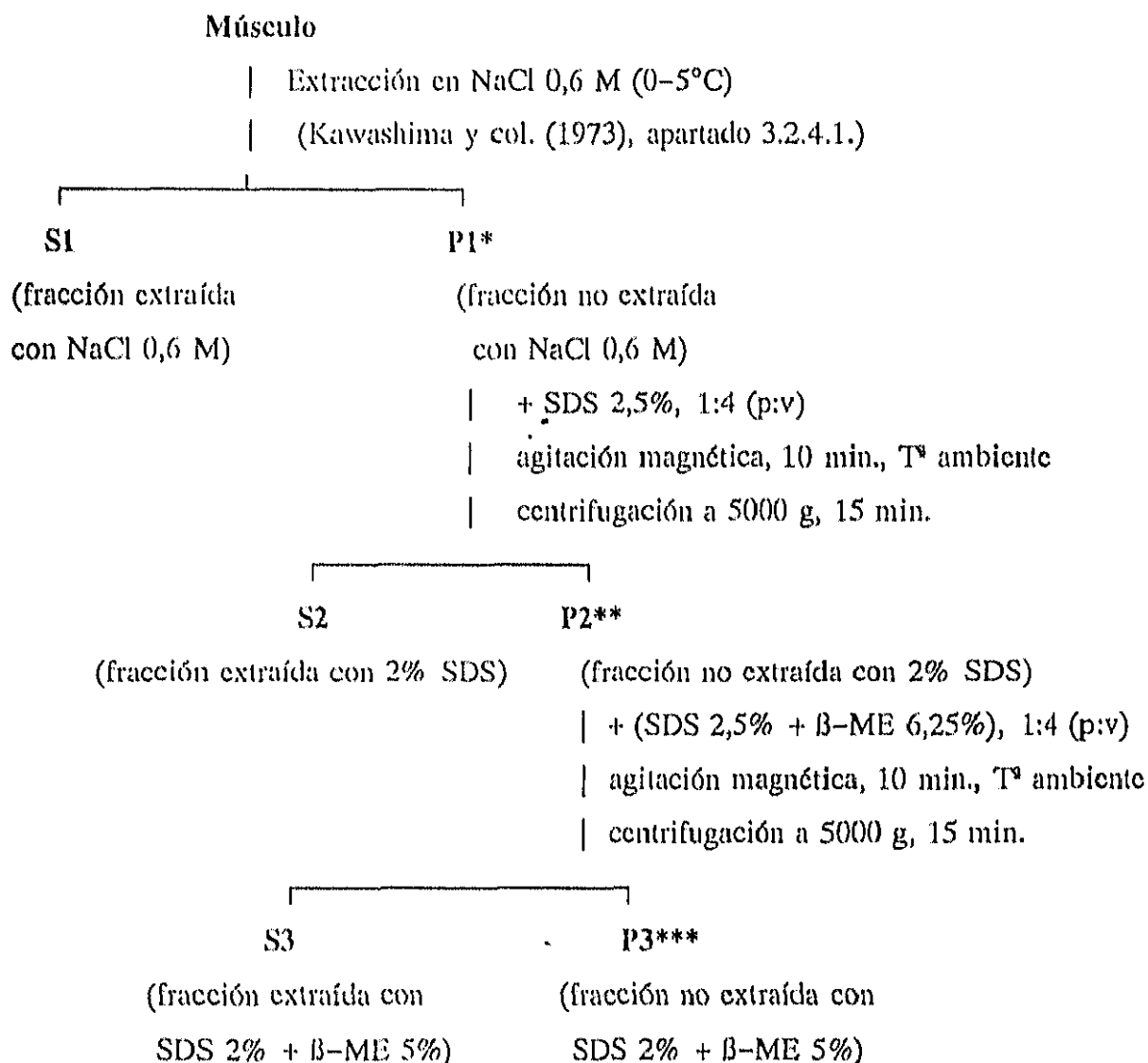
**B:** Tampón fosfato:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,30 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  15,5 mM, pH 7,5

**C:** Tampón tris maleico 0.05 M, pH 7

**D:** Tampón tris clorhídrico 0.05 M, pH 7

### 3.2.4.2.- Extractabilidad del agregado en Dodecilsulfato sódico (SDS) y $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME)

El estudio de la solubilidad en distintos agentes se llevó a cabo por el procedimiento descrito en el siguiente esquema :



\* El precipitado se lavó con un volumen igual de NaCl 0,6 M uniendo el sobrenadante a S1.

\*\* El precipitado se lavó con un volumen igual de 2% SDS y se centrifugó, uniendo el sobrenadante al S2.

\*\*\* El precipitado se lavó con un volumen igual de 2% SDS + 5%  $\beta$ -ME y se centrifugó, uniendo el sobrenadante al S3.

En cada una de las fracciones se determinó la concentración proteica por Kjeldahl (AOAC, 1984) y por Lowry (Lowry y col, 1951). El sobrenadante 1 (S1) corresponde a la fracción proteica extraída con NaCl 0,6M. El precipitado 1 (P1) se trató cuatro volúmenes de una solución de 2,5 % SDS en agua alcanzándose así una concentración final del 2% de SDS. La mezcla se agitó con agitador magnético durante 10 minutos, centrifugándose posteriormente a 5000 g durante 15 minutos como se indica en el esquema. El sobrenadante 2 (S2) corresponde a la fracción proteica extraída de P1 con 2% SDS. El precipitado no extraído con SDS (precipitado 2: P2) se trató con cuatro volúmenes de una solución acuosa con 2.5 % de SDS y 6.25% de  $\beta$ -ME alcanzándose así una concentración final de 2% de SDS y 5% de  $\beta$ -ME. Se agitó con agitador magnético durante 10 minutos, centrifugándose a continuación a 5000 g durante 15 minutos como se indica en el esquema. El sobrenadante 3 (S3) corresponde a la fracción proteica extraída con SDS al 2% y  $\beta$ -ME al 5%. El precipitado 3 (P3) corresponde a la fracción proteica que no se extrae en las condiciones estudiadas. Los resultados se expresaron en g de proteína extraída por g de proteína total de músculo. La proteína total se determinó midiendo su concentración por Kjeldahl (AOAC, 1984) tras extraerla del músculo por precipitación con ácido tricloroacético.

### 3.2.5.- MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION (MET)

En el lote de músculo picado de bacalao, las fracciones de AMN extraída en NaCl 0,6 M (S1) se estudiaron por MET. Estas fracciones se ajustaron con solución de NaCl 0,6 M a concentración de proteína de 0,15 mg/mL. Posteriormente se tiñeron con 1% uranyl acetato, usando el método descrito por Jarenbäck y Liljemark (1975).

Las fracciones de proteína agregada (P1, P2 y P3) del mismo lote se fijaron primero con glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato pH 7,2. y posteriormente con tetróxido de osmio al 1%. A continuación se lavaron y deshidrataron con acetona. Finalmente se

embebieron en Epon (Electron microscopy Sciences).

### 3.2.6.- ANALISIS EN LAS FRACCIONES PROTEICAS EXTRAIDAS (S1, S2 y S3)

#### 3.2.6.1.- Electroforesis (SDS-PAGE)

Los extractos de proteína en NaCl 0,6 M (S1), SDS 2% (S2) y SDS 2% + 5%  $\beta$ -ME (S3), ajustados a una concentración de 1,0 mg/mL, se analizaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en un sistema Phastsystem (Pharmacia) usando geles de poliacrilamida al 12,5%. Las muestras se trataron de acuerdo con el método de Laemmli (1970), modificado por Hames (1985) ajustando la concentración a 1,0 mg/mL de proteína y calentando durante 5 minutos a 100°C, SDS al 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,002% y PMSF a concentración final de 1mM. Posteriormente se centrifugaron durante 1 minuto a 10.000 g en una centrífuga de mesa y se aplicaron a los geles alícuotas de 1 $\mu$ L. Las condiciones electroforéticas fueron de 4,0 mA/gel, 250 V y 3 W. El peso molecular de las principales proteínas se calculó comparando su movilidad con la de una mezcla de proteínas estandar de alto peso molecular: ferritina (subunidad de 220 kDa); albúmina (67 kDa); catalasa (subunidad de 60 kDa); lactato deshidrogenasa (subunidad de 36 kDa) y ferritina (subunidad de 18,5 kDa).

Los geles fueron analizados en un Analizador de Imagen, obteniéndose los densitogramas y la densidad óptica integrada (DOI) de las bandas mayoritarias de CPM y Ac. Cuando la concentración de la muestra fue inferior a 1,0 mg/mL, el valor de la DOI se ajustó multiplicando por un factor  $f = 1/\text{concentración real (en mg/mL)}$ . Previamente se comprobó que existía linealidad entre la concentración de la muestra y el valor de la DOI en ambas bandas.

### 3.2.6.2.- Cromatografía de filtración en gel

Las fracciones solubles en NaCl 0.6 M (S1) se analizaron por cromatografía de filtración en gel. Hasta ser analizadas, las muestras se almacenaron a  $-18^{\circ}\text{C}$  en glicerol 50% (v/v). Previamente a su aplicación a la columna, estas se dializaron durante 12 horas en NaCl 0,6 M. A continuación se tomaron 2 mg de proteína dializada (2-3 mL), se filtraron a través de un filtro de tamaño de poro entre 0,8 y 8  $\mu\text{m}$  y se aplicaron a la columna, recogiendo alicuotas de 5,5 mL. La sensibilidad del detector de absorbancia a 280 nm se ajustó a 0,1 y la velocidad de flujo se mantuvo a 0,5 mL/min. La determinación de la concentración de la proteína se realizó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951), modificado por Peterson (1979). En los lotes de filetes de bacalao y músculo picado de merluza y bacaladilla se determinó además la cantidad de proteína retenida en el proceso de filtrado.

Se utilizó una columna de 55 cm de longitud y 2,5 cm de diámetro empaquetada con un relleno de Bio-Gel A-50. Esta fue equilibrada con solución de NaCl 0,6 M. Para comprobar su empaquetamiento, calibrarla y determinar el volumen de exclusión, se aplicaron azul de dextrano (2.000 kDa) y patrones de alto peso molecular suministrados por Pharmacia: Aldolasa (158 kDa) y Tiroglobulina (669 kDa).

Las operaciones se realizaron en cámara fría ( $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) para evitar fluctuaciones en la temperatura y la desnaturalización de la proteína durante el proceso cromatográfico.

### 3.2.6.3.- Actividad $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica

La determinación de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica se realizó en la AMN extraída en NaCl 0,6 M (S1). Se siguió el método de Kawashima y col., (1973) y midiéndose la cantidad de fósforo inorgánico (Pi) liberado de acuerdo con el método de Fiske y SubbaRow (1925). La AMN se diluyó a una concentración de 5 mg/ml con solución de



NaCl 0,6 M para realizar las medidas. Estas se llevaron a cabo a 25°C. Los resultados se expresaron en  $\mu$ moles de Pi liberado/min./mg proteína.

#### 3.2.6.4.- Grupos sulfhidrilo (-SH)

El contenido de grupos -SH se determinó en la AMN extraída en NaCl 0,6 M (S1) de acuerdo con la técnica descrita por Beveridge y col., (1974). La determinación fue realizada mediante la reacción del ácido 5-5'- ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) con los grupos -SH de las proteínas, formándose el nitrofenilato libre que tiene un máximo de absorción a 412 nm. Las determinaciones se hicieron ajustando la concentración de proteína a 5 mg/mL con NaCl 0,6 M. Los resultados se expresaron en  $\mu$ moles de -SH/g de AMN.

#### 3.2.6.5.- Hidrofobicidad superficial alifática (CPA) y aromática (ANS)

Se determinó la hidrofobicidad superficial de la AMN extraída en las fracciones S1. Se detectó la interacción de los ácidos 8-anilino-1naftaleno sulfónico (ANS) y cis-parinárico (CPA) con las localizaciones hidrofóbicas de la proteína de acuerdo con los métodos descritos por Hayakawa y Nakai (1985) para la hidrofobicidad aromática (ANS) y Kato y Nakai (1980) para la alifática (CPA). La AMN se diluyó con NaCl 0,6 M para ajustarla a las concentraciones adecuadas para la medida. Según el reactivo empleado se midió la intensidad de fluorescencia a distintas longitudes de onda de excitación: 325nm (CPA) y 390nm (ANS) y emisión: 420nm (CPA) y 470nm (ANS). Los resultados se expresaron como la pendiente de la regresión lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de proteína en unidades arbitrarias ( $S_0$ ).

### 3.2.6.6.- Viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ )

Esta medida se realizó sobre la AMN extraída en la fracción S1, de acuerdo con el método descrito en el apartado 3.2.2.1. Las determinaciones se realizaron en soluciones de AMN en 0,6 M NaCl de 5 y 2,5 mg/mL de concentración proteica, utilizando un baño de recirculación para mantener la temperatura entre 0 y 2°C.

Se midió la viscosidad de una solución de AMN en SDS 2% de 2,5 mg/mL de concentración proteica, y a 25°C, tomándose como testigo para esta medida el valor correspondiente a la proteína disuelta en NaCl 0,6 M y a 25°C.

### 3.2.6.7.- Índice de actividad de emulsión (IAE)

El IAE de la AMN extraída en NaCl 0,6 M (S1) se determinó utilizando el método descrito por Pierce y Kinsella (1978), modificado por Li-Chan y col. (1984). Para cada medida se tomaron 3,0 mL de solución de AMN en NaCl 0,6 M de 5 mg/mL de concentración proteica y se les añadió 1,0 mL de aceite de oliva. La mezcla se introdujo en una microcámara conectada a un Omnimixer y se homogeneizó (en posición 5) durante un minuto a 25°C. Inmediatamente después se tomó una alícuota del fondo de la emulsión. Esta fue diluida 200 veces con una solución de SDS 0,3%. Mediante agitación se obtuvo una dispersión uniforme y determinó su absorbancia a 500 nm.

### 3.2.7.- SISTEMAS MODELO DE AMN AISLADA

Se prepararon dos sistemas modelo con AMN aislada por el método descrito en el apartado 3.2.3.1. En el primer sistema modelo (SM1) se pretendía estudiar la acción de formaldehído (FA) sobre la AMN durante su conservación en congelación. Para ello se extrajo AMN de músculo fresco, se congeló y conservó en congelación con distintas

concentraciones de FA y se estudió la solubilidad en NaCl 0,6 M a lo largo del periodo de conservación. Las fracciones solubles fueron analizadas por electroforesis (SDS-PAGE). Este sistema modelo se realizó inicialmente con AMN de merluza (SM1a). Posteriormente se realizó utilizando AMN de bacalao y bacaladilla (SM1b) e introduciendo cambios en las concentraciones de FA añadido de acuerdo con lo obtenido en el SM1a. También se modificó la metodología al introducir un lavado del precipitado insoluble obtenido y modificar el método de determinación de concentración proteica.

Se preparó otro sistema modelo (SM2) en el que se pretendía estudiar los enlaces que participan en la agregación de la AMN así como las proteínas miofibrilares implicadas en los mismos. Para ello se congeló y conservó en congelación AMN de tres especies sin y con FA añadido. Periódicamente se determinó la solubilidad y extractabilidad del insoluble en varios agentes. También se realizaron electroforesis de cada una de las fracciones solubles y extraídas. Se empleó una proporción proteína/FA adecuada para poder realizar las medidas, de acuerdo con lo obtenido en el SM1. En este sistema modelo (SM2), al igual que en SM1b, se lavó el precipitado no solubilizado o no extraído con cada tratamiento.

### 3.2.7.1.- Estudio de la concentración de FA (SM1)

Como ya se ha indicado, en este sistema modelo se estudió AMN aislada de merluza (SM1a) y posteriormente se estudió la AMN de bacalao y bacaladilla en el SM1b

#### Especies utilizadas

Las especies estudiadas fueron bacalao (*Gadus morhua*, L), merluza (*Merluccius merluccius*, L) y bacaladilla (*Micromesistius poutassou*, R). Estos fueron capturados 24 horas antes de su llegada a nuestro laboratorio y se encontraban en estado de post-rigor.

La época de captura fue Junio en merluza y Abril en bacalao y bacaladilla.

## **Preparación del sistema modelo**

### Estudio en AMN de merluza (SM1a)

En cada especie estudiada, la AMN se aisló a partir de 150 g de un picado mezcla de distintas zonas del músculo de tres o más ejemplares. La concentración se determinó por el método de microbiuret (Itzaki y Gill, 1964).

Con la AMN extraída se prepararon 5 lotes:

- Testigo (T): solución de AMN (5 mg/mL) en NaCl 0,6 M. Sin FA añadido.
- F2': Similar al testigo. Se preparó para añadirle FA 3 mM en fresco y en cada control tras descongelar.
- F2, F3 y F4: AMN (5mg/mL) en 0,6 M NaCl con FA añadido hasta concentraciones de 3, 6 y 120 mM respectivamente.

El FA se añadió a la solución de NaCl 0,6 M, antes de diluir con esta la AMN para ajustarla a la concentración final (5mg/mL). Todos los lotes se mantuvieron en agitación permanente durante 30 minutos con agitador magnético antes de ser repartidos en alícuotas de 10 mL en tubos de poliestireno cerrados herméticamente. Todas las operaciones se realizaron en cámara fría ( $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

Se hizo un primer control en fresco (0') y se congelaron todos los lotes a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se almacenaron a dicha temperatura durante 60 días durante los cuales se realizaron 3 controles a los 5, 15, 30 y 60 días de conservación. Al lote F2' se le añadió FA hasta concentración de 3 mM antes de realizar las medidas tanto fresco (0') como en los

controles realizados lo largo de la conservación (después de descongelar la muestra). Por tanto, en el control en fresco los lotes F2' y F2 fueron similares y se denominaron de forma conjunta como lote F2'-2.

#### Estudio en AMN de bacalao y bacaladilla (SM1b)

Para cada especie se partió de 100 g de un picado de distintas zonas del músculo de tres o más ejemplares. La preparación del este sistema modelo fue, en general, igual que la del sistema modelo de merluza anterior, con la diferencia de las cantidades de formaldehído añadidas. Estas se seleccionaron en función de los resultados obtenidos en el sistema modelo de músculo de merluza. Así, en este estudio, los lotes preparados con la AMN extraída de cada especie fueron:

- Testigo (T): solución de AMN (5 mg/mL) en NaCl 0,6 M. Sin FA añadido.
- F1': Similar al testigo. Se preparó para añadirle FA 1,5 mM en fresco y en cada control tras descongelar.
- F1, F2 y F3: solución de AMN (5mg/mL) en 0,6 M NaCl con FA añadido hasta concentraciones de 1,5, 3 y 6 mM respectivamente.

Se realizó un primer control en fresco (0') y se congelaron todos los lotes a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se almacenaron a dicha temperatura durante 30 días, realizándose 3 controles a los 5, 15 y 30 días de conservación en congelación. Al lote F1' se le añadió FA hasta concentración de 1,5 mM antes de realizar las medidas tanto fresco (0') como en los controles realizados lo largo de la conservación (después de descongelar la muestra). Por tanto, en el control en fresco los lotes F1' y F1 fueron similares y se denominaron de forma conjunta como lote F1'-1.

## Análisis efectuados

### Solubilidad

En cada control, tras descongelar los tubos en agua y hielo, se centrifugaron durante 15 minutos a 5.000 g en centrífuga refrigerada entre 0 y 5 °C. Como ya se ha indicado, en el estudio en merluza no se realizó lavado del precipitado obtenido en esta centrifugación. En el estudio con AMN de bacalao y bacaladilla (SM1b) se introdujo el lavado de este precipitado con 1 mL de solución de NaCl 0,6 M NaCl, seguido de centrifugación en las mismas condiciones anteriores. El sobrenadante obtenido en la segunda centrifugación se unió al obtenido en la primera.

La concentración de proteína en el sobrenadante se determinó utilizando los métodos de Microbiuret (Itzaki y Gill, 1964) en merluza (SM1) y de Lowry (Lowry y col. 1951) modificado por Peterson (1979) en bacalao y bacaladilla (SM1b). Los resultados se expresaron como porcentaje de proteína soluble frente a proteína total.

### Electroforesis (SDS-PAGE)

Las fracciones de AMN soluble obtenidas en cada control en cada uno de los lotes se analizaron por electroforesis (SDS-PAGE) en un sistema horizontal Phastsystem (Pharmacia) según la metodología y condiciones que se describen en el apartado 3.2.4.1. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12,5 % y al 7.5%. En todas las fracciones solubles obtenidas en SM1b (bacalao y bacaladilla) se ajustó la concentración de proteína a 1 mg/mL y se aplicó 1µl de esta dilución sobre el gel de electroforesis, con excepción de las fracciones cuya concentración fue inferior a 1 mg/mL. En el caso del SM1a (merluza) no se ajustó la concentración previamente.

### 3.2.7.2.- Estudio de la agregación de AMN aislada (SM2)

Como ya se ha indicado, en este sistema modelo se pretendía estudiar la solubilidad de la AMN, con y sin FA añadido, en NaCl 0,6 M y la extractabilidad en distintos agentes del agregado insoluble a lo largo de la conservación en congelación. La relación proteína /FA se eligió de acuerdo con los resultados obtenidos en el SM1.

#### Especies utilizadas

Las especies estudiadas fueron bacalao (*Gadus morhua*, L), merluza (*Merluccius merluccius*, L) y bacaladilla (*Micromesistius poutassou*, R). Estos fueron capturados 24 horas antes de su llegada a nuestro laboratorio y se encontraban en estado de post-rigor. La época de captura fue Junio para las tres especies.

#### Preparación del sistema modelo

En cada especie estudiada, la AMN se aisló por el método descrito en el apartado 3.2.3.1. a partir de 150 g de un picado mezcla de distintas zonas del músculo de tres o más ejemplares. La concentración se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) modificado por Peterson (1979).

Con la AMN extraída de cada especie se prepararon dos lotes:

- Testigo (B, M y A, para bacalao, merluza y bacaladilla, respectivamente). Solución de AMN (10 mg/mL) en NaCl 0,6 M.
- Con FA (BF, MF y AF, para bacalao, merluza y bacaladilla, respectivamente). Solución de AMN (10 mg/mL) en NaCl 0,6 M, con FA 6 mM.

El FA se añadió a una solución de NaCl 0,6 M, antes de diluir con esta la AMN para ajustarla a la concentración final (10 mg/mL). Ambos lotes (testigo y con 6mM de FA) se mantuvieron en agitación permanente con agitador magnético durante 30 minutos antes de repartirla en alícuotas de 10 mL en tubos de poliestireno cerrados herméticamente. Todas las operaciones se realizaron en cámara fría ( $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

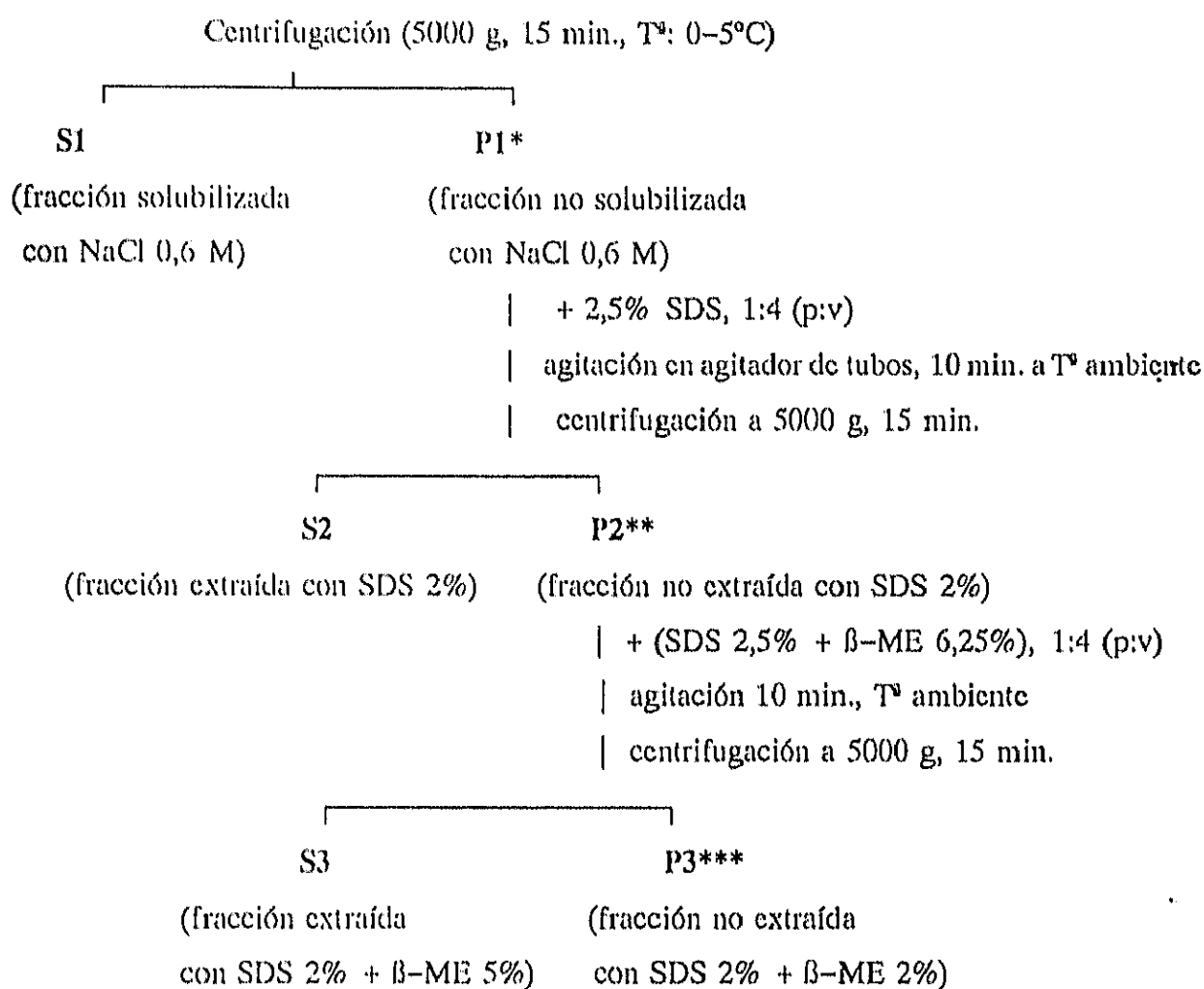
Se realizó un primer control en fresco (0'), congelando el resto de los tubos de todos los lotes a  $-20^{\circ}\text{C}$  y almacenándolos a dicha temperatura durante 30 días. A lo largo de la conservación se realizaron 3 controles: a los 5, 15 y 30 días.



## Análisis efectuados

### Solubilidad y extractabilidad

Tanto en fresco como en cada control a lo largo de la conservación, tras descongelar los tubos en agua y hielo, se llevó a cabo un estudio de solubilidad y extractabilidad del agregado insoluble según el siguiente protocolo:



\* El precipitado se lavó con 1 mL de NaCl 0,6 M y se centrifugó en las mismas condiciones, uniendo el sobrenadante al S1.

\*\* El precipitado se lavó con 1 mL de 2% SDS y se centrifugó, uniendo el sobrenadante al S2.

\*\*\* El precipitado se lavó con 1ml de 2% SDS + 5% β-ME y se centrifugó, uniendo el sobrenadante al S3.

### Electroforesis (SDS-PAGE)

Las fracciones de AMN solubles en NaCl 0,6 M (S1) y extraídas en SDS 2% (S2) y en 2% SDS + 5%  $\beta$ -ME obtenidas en cada control en cada uno de los lotes se analizaron por electroforesis (SDS-PAGE) en un sistema horizontal Phastsystem (Pharmacia) según la metodología y condiciones que se describen en el apartado 3.2.4.1. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 12,5 %. En todas las fracciones se ajustó la concentración de proteína a 1 mg/mL y se aplicó 1  $\mu$ l de esta dilución sobre el gel de electroforesis, con excepción de las fracciones cuya concentración fue inferior a 1 mg/mL.

### **3.2.8.- ANALISIS ESTADISTICO**

#### **Análisis de las variables medidas en músculo conservado en congelación y en la AMN aislada periódicamente del mismo durante la conservación**

Para cada variable estudiada se realizaron dos análisis de varianza de dos vías: en función del tiempo y la especie y en función del tiempo y grado de integridad de músculo. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics STSC Inc. (EEUU). Las diferencias de medias entre pares se resolvieron por medio de un test LSD para obtener los intervalos de confianza para cada análisis de varianza. El nivel de significación se estableció para  $P < 0.05$ .

Se realizó un análisis de correlación lineal entre pares de variables por medio del coeficiente de correlación de Pearson, aplicándolo separadamente para cada lote estudiado. La matriz de correlación se obtuvo con el programa estadístico Statgraphics STSC Inc. (EEUU). El nivel de significación se estableció para  $P < 0.05$ .

## Análisis de las variables medidas en los sistemas modelo

En el sistema modelo SM1, se realizó estudio estadístico de los valores de solubilidad obtenidos (apartado 3.2.5.). En las tres especies estudiadas se realizó un análisis de varianza de dos vías en función del tiempo de conservación y el lote (testigo y con diferentes cantidades de FA, ver apartado 3.2.5.). En cada lote de bacalao y bacaladilla se realizó además un análisis de varianza de dos vías en función del tiempo de conservación y la especie.

En el sistema modelo SM2, se realizó el estudio estadístico de los valores de solubilidad y extractabilidad en cada una de las fracciones (apartado 3.2.5.). Con los valores obtenidos en cada especie se realizó un análisis de varianza de dos vías en función del tiempo de conservación y el lote (testigo y con FA, ver apartado 3.2.5.). Con los valores obtenidos en cada lote se hizo un análisis de varianza de dos vías en función del tiempo de conservación y la especie.

En ambos estudios estadísticos se utilizó el programa informático Statgraphics STSC Inc. (EEUU). Las diferencias de medias entre pares se resolvieron por medio de un test LSD para obtener los intervalos de confianza para cada análisis de varianza. El nivel de significación se estableció para  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION

## 4.- RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1.- ANALISIS ELEMENTALES Y pH

La tabla 4.1. recoge los resultados de los análisis iniciales del músculo realizados en los distintos lotes.

	%Proteína bruta	%Grasa bruta	%Humedad	%Cenizas	pH
B	17,8 ( $\pm 0,6$ )	0,81 ( $\pm 0,01$ )	80,92 ( $\pm 0,07$ )	1,38 ( $\pm 0,02$ )	7,03 ( $\pm 0,01$ )
M	17,41 ( $\pm 0,22$ )	1,34 ( $\pm 0,1$ )	82,61 ( $\pm 0,16$ )	0,92 ( $\pm 0,03$ )	6,67 ( $\pm 0,01$ )
A	14,81 ( $\pm 0,4$ )	0,97 ( $\pm 0,01$ )	84,55 ( $\pm 0,19$ )	0,87 ( $\pm 0,05$ )	7,02 ( $\pm 0,02$ )
BF	19,00 ( $\pm 0,58$ )	1,16 ( $\pm 0,16$ )	80,22 ( $\pm 0,07$ )	1,45 ( $\pm 0,12$ )	6,82 ( $\pm 0,02$ )

Tabla 4.1. Análisis elementales y pH de músculo picado de bacalao (B), meluza (M) y bacaladilla (A) y de filetes de bacalao conservados en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  (BF).

En bacalao todos los valores se encuentran dentro de los límites normales descritos en las especies magras (Stansby, 1961; Suzuki, 1987); . En bacaladilla los valores observados estuvieron en el rango de los que encontraron Huidobro y Tejada (1993 a) en ejemplares de esta especie capturados en verano. Los valores bajos de proteína bruta y altos de humedad se podrían relacionar con el hecho de que la muestra se capturó en época de desove. En bacaladilla se han descrito cambios en composición importantes dependiendo del estadio del

ciclo reproductivo en que se encuentre (Smith y col., 1980, Whittle y col., 1980).

En merluza, el contenido en grasa fue ligeramente mayor que el encontrado por otros autores (Suzuki, 1987; Careche, 1988). El resto de los análisis elementales realizados en esta especie (humedad, cenizas y proteínas) dieron valores similares a los encontrados en la bibliografía (Kleimenov, 1983; García Palacios, 1987, Careche, 1988; González, 1991).

## **4.2.- ANALISIS DE CONTROL DE CALIDAD DEL MUSCULO**

### **4.2.1.- SOLUBILIDAD PROTEICA (SOL/TOT)**

Desde hace décadas muchos autores han descrito un descenso de la extractabilidad proteica en músculo de pescado durante la conservación por congelación (Dyer, 1951; King, 1966; Connell y Howgate, 1968 y 1969; Castell y col., 1973; Tokunaga; 1974, Jiménez Colmenero y Borderías, 1983; Tejada y col., 1984; Careche y Tejada, 1990 a y b y Huidobro y Tejada, 1993 a y b, entre otros). El porcentaje de proteína extraída en soluciones salinas frente a la proteína total del músculo se utiliza como medida de calidad de la proteína del músculo durante la conservación. Se considera que su disminución es el resultado de la desnaturalización y agregación proteica causada por el incremento progresivo de los enlaces intermoleculares, debido a la formación de puentes de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos, puentes disulfuro y probablemente enlaces covalentes distintos a los puentes disulfuro (Matsumoto, 1980).

Aunque en la técnica empleada se mide la proteína total (miofibrilar, y sarcoplásmica), se sabe que, dentro de las proteínas mayoritarias del músculo, las sarcoplásmicas no modifican apenas su solubilidad, aunque presentan un cierto grado de alteración (Tejada y col, 1987) mientras que las miofibrilares son las principales responsables de la agregación durante la conservación por congelación (Rehbein, 1985; Poulter y Lawrie, 1979; González, 1991; Huidobro y Tejada, 1993 b).

# PROTEINA SOLUBLE (SOL/TOT)

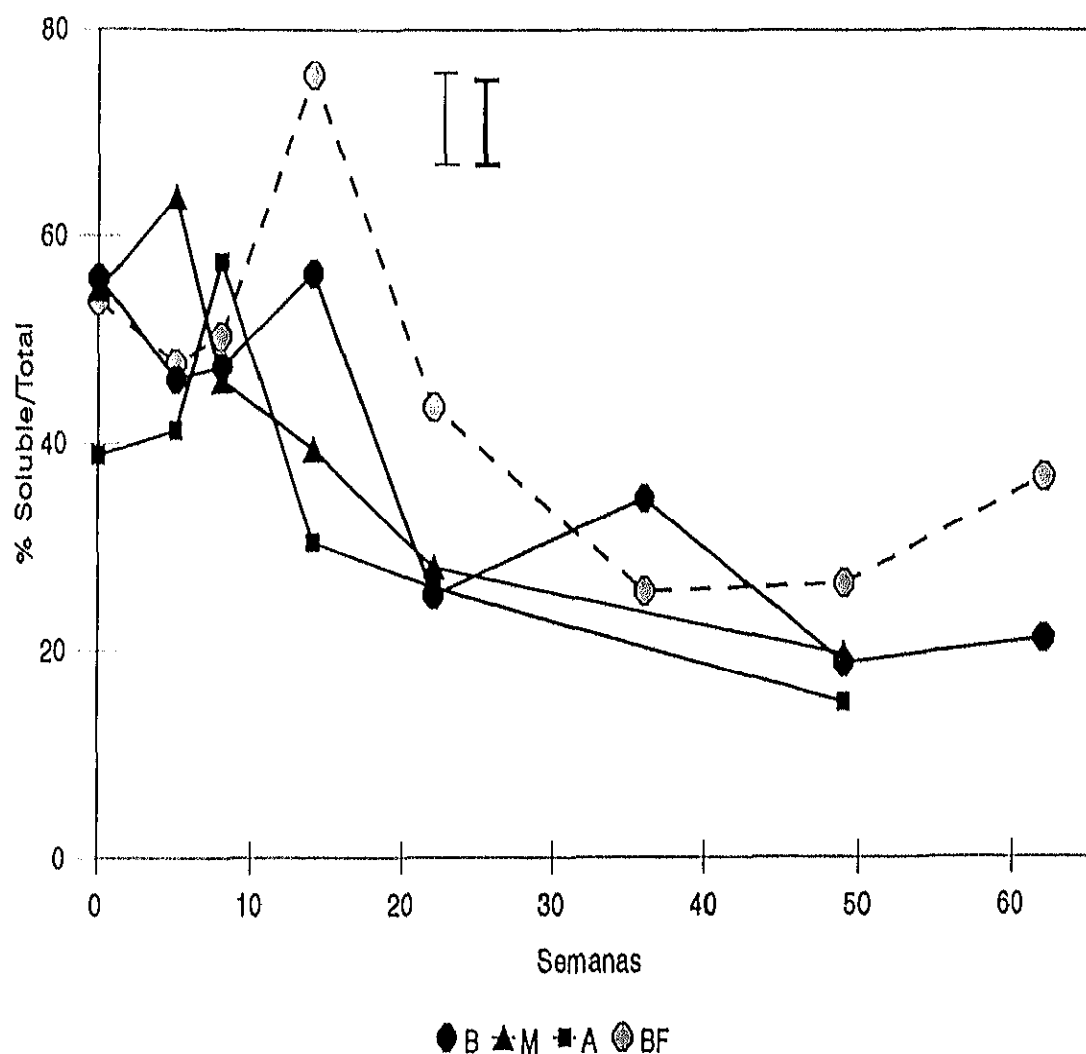


Figura 4.1.- Evolución del porcentaje de solubilidad proteica (SOL/TOT) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  en los lotes de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A).

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
SOL/TOT	***	***	***

Tabla 4.2. a – Análisis de la varianza correspondiente a la medida de proteína soluble (Sol/Tot) (%) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
SOL/TOT	***	***	***

Tabla 4.2. b – Análisis de la varianza correspondiente a la medida de proteína soluble (Sol/Tot) (%) de músculo de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y de la especie.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo



Los cambios en porcentaje de proteína extraída en NaCl 0,6 M se representan en la figura 4.1. En las tablas 4.2. a y b están recogidos los resultados del análisis estadístico correspondiente a estas medidas. En todos los lotes se observó una tendencia a disminuir por efecto de la conservación en congelación.

En filetes y músculo picado de bacalao se detectó una tendencia significativa al descenso que comenzó en las semanas 36 y 22 respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre ambos lotes de bacalao durante las 8 primeras semanas de conservación. A partir de la semana 14, el lote de filetes presentó valores en general superiores a los del lote de músculo picado. Los valores iniciales observados en ambos lotes de bacalao fueron inferiores a los descritos por Tejada y col. (1984) para músculo picado de dicha especie conservado a  $-12^{\circ}\text{C}$ , aunque en etapas avanzadas de la conservación los valores detectados por dichos autores fueron similares a los encontrados en este trabajo en músculo picado de bacalao. Babbitt y col. (1972) han descrito valores de proteína soluble frente a total superiores en filetes de merluza que en músculo picado conservados a  $-30^{\circ}\text{C}$ , encontrando diferencias de entre el 20 y el 10%, similares a las observadas por nosotros en bacalao a partir de la semana 14 de conservación. Este descenso más rápido observado en músculo picado respecto a filete fue también descrito por Hiltz y col. (1976) y Crawford y col. (1979) en merluza durante la conservación en congelación.

Los porcentajes de proteína soluble de músculo picado de merluza y bacalao fueron inicialmente más elevados que en bacaladilla. Posteriormente no se observaron diferencias sostenidas a lo largo del tiempo entre lotes de músculo picado. El porcentaje de proteína soluble frente a total desciende significativamente a partir de la semana 8 de conservación, en merluza, y de la 14, en bacaladilla. El descenso observado desde el inicio hasta el final del periodo de conservación fue mayor en bacalao y merluza que en bacaladilla debido a los valores menores que presentó esta última al principio del estudio.

Los valores iniciales en merluza fueron inferiores a los descritos por Careche y Tejada, 1990 a y Jiménez Colmenero y col. (1988) para músculo picado de merluza conservada a

-18°C, aunque en las etapas finales del estudio fueron muy similares a los obtenidos en este trabajo. En bacaladilla también se obtuvieron valores inferiores a los estimados por otros autores para esa misma especie (Jiménez Colmenero y col., 1988; Huidobro y Tejada, 1992 y 1993 a), siendo del mismo rango los encontrados al final del periodo de conservación, por lo que el descenso de la proteína soluble en bacaladilla fue también menos acentuado.

En los lotes de filetes de bacalao y músculo picado de bacaladilla se observó un incremento significativo en las semanas 14 y 8 respectivamente. Este incremento no se encontró descrito en la bibliografía previamente.

Castell y col. (1971) encontraron diferencias en solubilidad proteica entre merluza y bacalao, durante la conservación en congelación a -5°C. En nuestro caso no se encontraron diferencias tan acentuadas entre dichas especies, probablemente debido a que la temperatura de conservación fue mucho menor.

La bacaladilla posee un grado de variabilidad estacional muy grande y su calidad general baja mucho inmediatamente después del desove (Smith y col., 1980). Teniendo en cuenta la fecha de captura, como ya se ha comentado en el apartado anterior, parte de los individuos utilizados como muestra se encuentran en este estadio y ello explicaría los menores valores iniciales de solubilidad encontrados en esta especie. Algunos autores han indicado su mayor inestabilidad respecto a otras especies de gádidos durante la conservación por congelación (Daghjartsson, 1975; Rehbein, 1988; Ofstad y col., 1992) y lo han atribuido a la mayor contaminación del músculo blanco con las vísceras durante el picado, debido a su menor tamaño (Ofstad y col., 1992). A pesar de que las muestras fueron evisceradas y lavadas (apartado 2.2.), siempre es posible que exista cierto grado de contaminación, tanto mayor cuanto más pequeño es el tamaño de los individuos.

Nuestros resultados ponen de manifiesto la influencia del grado de integridad del músculo en la extractabilidad proteica. Se produce un mayor deterioro de la calidad en músculo durante la congelación en el músculo picado, confirmando lo observado por otros autores (Babbitt y col., 1972; Hiltz y col., 1976; Crawford y col., 1979).

#### 4.2.2.- VISCOSIDAD APARENTE ( $\eta_{ap}$ )

La viscosidad de las soluciones proteicas es una propiedad funcional cuya medida es utilizada frecuentemente como método para determinar el grado de desnaturalización y agregación proteica (Borderías y col., 1983). Los principales factores que afectan al comportamiento viscoso de una solución o dispersión proteica son el número de partículas, su tamaño y relación axial (Rha y Paradipaseña, 1986). El tamaño de las partículas depende de parámetros tales como las características intrínsecas de la proteína: masa, volumen, estructura, asimetría etc. Estas características se ven influenciadas a su vez por las interacciones proteína-solvente (que afectan al hinchamiento de la molécula y zona de hidratación hidrodinámica) y por las interacciones proteína-proteína. Cuando la proteína miofibrilar se agrega disminuye la relación axial de las partículas solubilizadas, lo cual podría dar lugar a un descenso en la  $\eta_{ap}$  de la dispersión (Huidobro y Tejada, 1993 b).

En la figura 4.2. se observa que en todos los lotes se produjo un descenso significativo de la  $\eta_{ap}$  durante la conservación en congelación. En la tablas 4.3. a y b se representan los resultados del análisis estadístico correspondiente.

Los lotes de bacalao no presentaron diferencias significativas al inicio de la conservación y las medidas fueron similares a las que observaron Chalmers y col. (1992) en dicha especie en fresco. En ambos lotes se produjo un descenso significativo de tal forma que la semana 22 de conservación se alcanzaron valores casi nulos (en las condiciones de medida) en el lote de músculo picado. Estos valores fueron similares a los encontrados por Tejada y col. (1984) en etapas avanzadas de la conservación en congelación de músculo picado de esta especie conservado a  $-12^{\circ}\text{C}$ . En filetes, los valores fueron significativamente superiores desde la semana 22 y hasta el final de la conservación.

Al comparar los lotes de músculo picado se aprecia que merluza y bacaladilla presentaron un descenso parecido y más gradual que el observado en bacalao así como valores

## VISCOSIDAD APARENTE ( $\eta_{ap}$ )

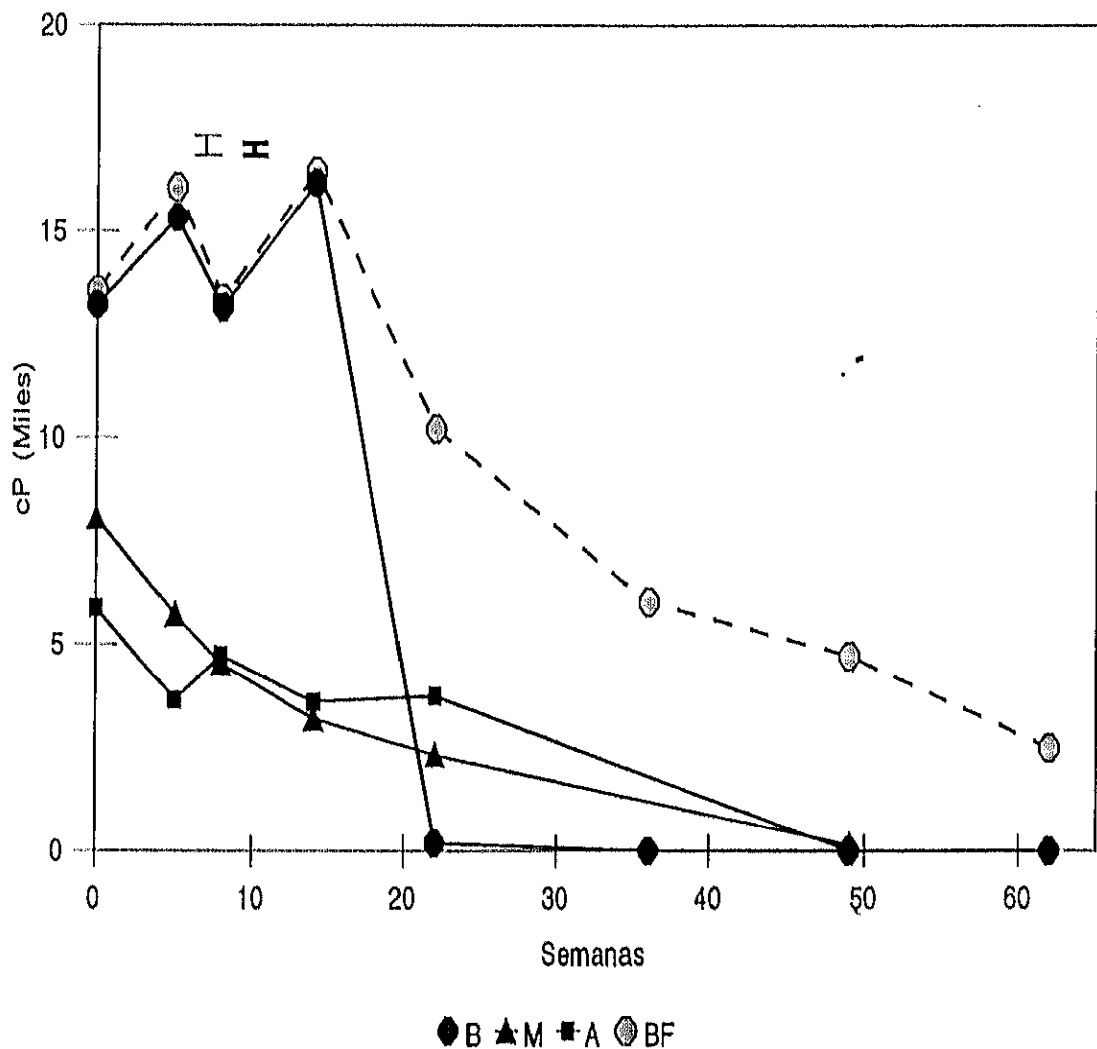


Figura 4.2.- Evolución de la viscosidad aparente de músculo ( $\eta_{ap}$ ) (cP) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  en los lotes de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A).

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

iniciales menores. En merluza y bacaladilla se detectaron valores de  $\eta_{sp}$  en las condiciones de medida durante más tiempo que en bacalao. Entre los lotes de merluza y bacaladilla se observaron también diferencias significativas, presentando la merluza valores superiores inicialmente e inferiores a partir de la semana 8. Sin embargo, la tendencia a disminuir a lo largo del tiempo fue muy similar entre dichos lotes. En merluza, los valores iniciales fueron similares a los encontrados por Tejada y Careche (1988) en músculo picado de esta especie, aunque el descenso observado en este caso fue menos brusco que el descrito por dichos autores. En bacaladilla, Jiménez Colmenero y Borderías, (1983) y Huidobro y Tejada (1993 a) encontraron inicialmente valores inferiores y un descenso más rápido con el tiempo.

Por otro lado, Crupkin y col. (1979); Barassi y col. (1982) y Jiménez Colmenero y col. (1988) en merluza y Huidobro y Tejada (1993 a) en bacaladilla, observaron influencia de la época de captura en los valores de  $\eta_{sp}$  de músculo fresco y en el tipo de cambio observado durante la conservación. Esto explica la variabilidad en cuanto a valores iniciales y tendencias observadas por los distintos autores, que hace difícil la comparación de los mismos con los obtenidos en el presente estudio. A pesar de ello, los resultados confirman la tendencia al descenso de la  $\eta_{sp}$  a lo largo del tiempo de conservación en congelación detectada en otros estudios (Jiménez-Colmenero y Borderías, 1983; Borderías y col., 1985 a; Tejada y col., 1987 y Jiménez-Colmenero y col., 1988). Este fue más acentuado en músculo picado que en filetes, reflejando la influencia del grado de integridad del músculo.

El estudio de las correlaciones entre  $\eta_{sp}$  de homogeneizados de músculo y proteína soluble muestra la existencia de una interdependencia significativa entre ambos valores para los distintos lotes (tablas 4.7., 4.8., 4.9. y 4.10.). Esto está de acuerdo con lo observado por distintos autores (Jiménez-Colmenero y Borderías, 1983; Borderías y col., 1985 a y b; Tejada y col., 1984 y Jiménez-Colmenero y col., 1988) los cuales comprobaron que la  $\eta_{sp}$  de homogeneizados de músculo disminuye con el tiempo de conservación y que se correlaciona con una reducción en la solubilidad proteica y por tanto con una mayor agregación proteica. Dicha agregación influiría en el descenso observado en la  $\eta_{sp}$  debido en parte a una disminución de la superficie específica y por tanto del número de interacciones entre los restos hidrofílicos de las proteínas con el solvente (Matsumoto, 1979 y 1980). Sin embargo, si los

agregados presentes en los homogeneizados de músculo son lo suficientemente grandes, estos pueden quedar retenidos al filtrar (apartado 3.2.2.1.), dando lugar a una disminución de la concentración proteica de los filtrados sobre los que se realiza la medida, lo cual influiría en el descenso observado en  $\eta_{sp}$ .

#### 4.2.3.- DIMETILAMINA (DMA)

El aumento de las concentraciones de DMA durante la conservación en congelación ha sido descrito por muchos autores en diferentes especies de gadiformes (Castell y col., 1970, 1971; Babbitt y col. 1972; Owusu-Ansah y Hultin, 1986; LeBlanc y col., 1988; Careche y Tejada, 1990 a y b; Huidobro y Tejada, 1992, entre otros) y confirma la presencia de actividad OTMA desmetilasa a temperatura de conservación de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se sabe que el grado de manipulación que se aplica a las especies de pescado formadoras de FA y DMA afecta a la formación de FA y DMA (Mackie y Thomson, 1974; Babbitt y col., 1972; Hiltz y col. 1976; Dingle, 1978; Crawford y col., 1979). Esto se cree que es debido a que el picado del músculo ayuda a la distribución uniforme de la OTMAasa al mezclarse músculo rojo y blanco durante el procesado, acelerando la formación de DMA (Castell, 1971; Tokunaga, 1974; Dingle, 1978; Jahneke y col., 1992).

En la figura 4.3. se representan los valores de DMA obtenidos a lo largo del tiempo de conservación. Las tablas 4.4. a y b recogen el análisis de varianza correspondiente. Se observó un aumento significativo en todos los lotes.

En cuanto a los valores observados en bacalao, estos fueron significativamente superiores en el lote de músculo picado que en filetes a partir de la semana 8 de conservación (tabla 4.4. a y figura 4.3). En ambos lotes, los niveles detectados estuvieron en el rango de los observado por Rehbein (1988) en músculo entero de dicha especie conservado entre  $-25$  y  $-30^{\circ}\text{C}$  durante 3 meses. También LeBlanc y col. (1988) detectaron niveles de DMA similares a los observados en este trabajo en filetes de bacalao conservados a  $-30^{\circ}\text{C}$ . Sin

# DIMETILAMINA (DMA)

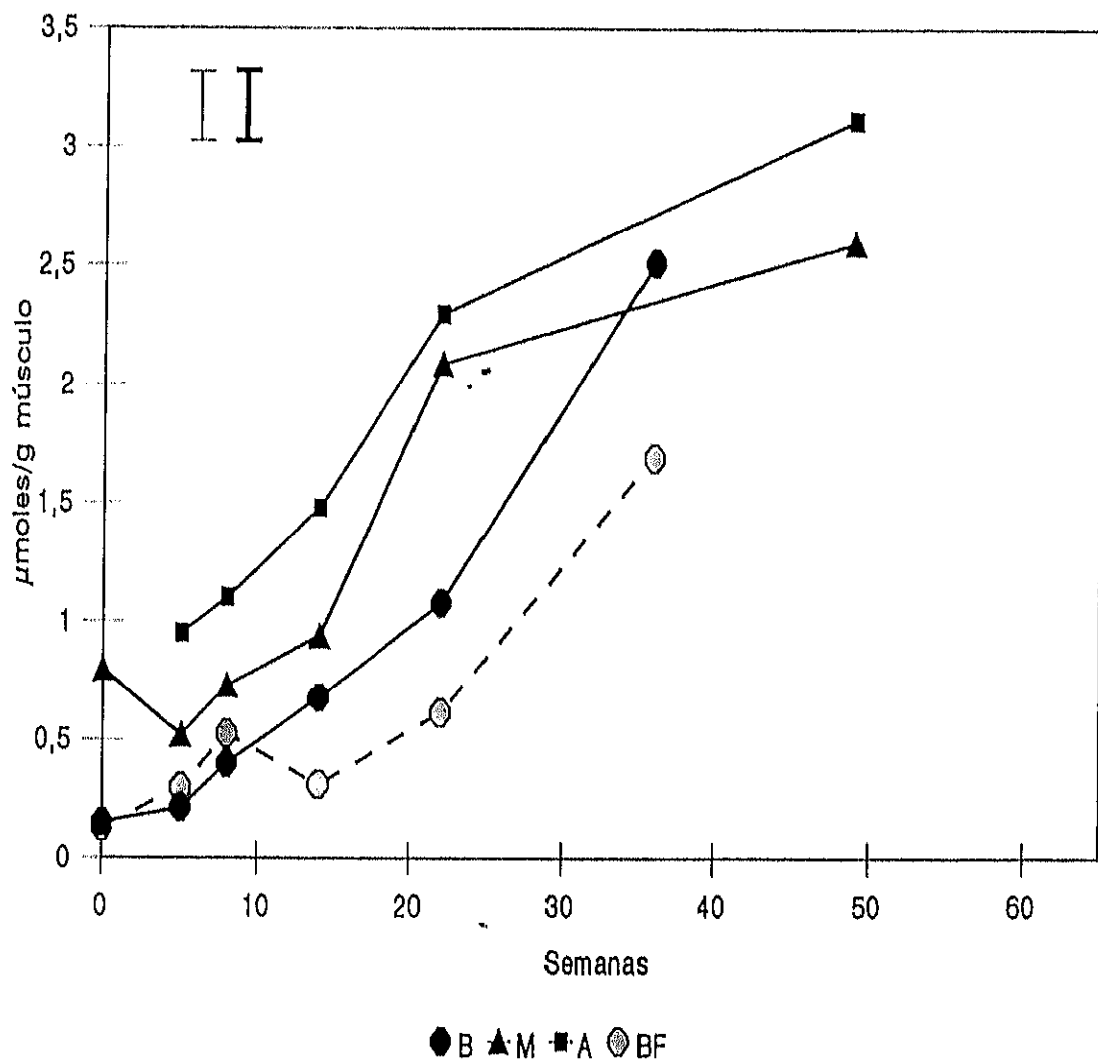


Figura 4.3.- Evolución de los niveles de dimetilamina (DMA) ( $\mu\text{moles/g}$  músculo) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  en los lotes de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A).

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
DMA	***	**	***

Tabla 4.4. a – Análisis de la varianza correspondiente a la medida de dimetilamina (DMA, en  $\mu$ moles de DMA/g músculo) de músculo picado y filetes (B y BF respectivamente) de bacalao en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
DMA	***	***	***

Tabla 4.4. b – Análisis de la varianza correspondiente a la medida de dimetilamina (DMA, en  $\mu$ moles de DMA/g músculo) de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado.

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y de la especie.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

– = Efecto no significativo



embargo, Castell y col. (1971); Dingle y Hines, (1975) y Dingle (1978) observaron valores superiores en filetes y músculo picado de bacalao conservado a  $-10^{\circ}\text{C}$  o  $-5^{\circ}\text{C}$ . La mayor temperatura de conservación empleada por dichos autores es probablemente la causa de estas diferencias.

Diversos estudios como los llevados a cabo en merluza por Babbitt y col. (1972) (*Merluccius productus*) y por Hiltz y col. (1976) (*Merluccius bilinearis*), demostraron que el efecto del picado del músculo daba lugar a la formación de niveles de DMA dos veces superiores respecto a los encontrados en filetes a lo largo de la conservación en congelación. Diferencias entre músculo picado y filetes que se encuentran más en el rango de las obtenidas en este trabajo en bacalao, fueron observadas por Dingle (1978) en merluza (*Merluccius bilinearis*) y brosmio (*Brosme brosme*).

Los lotes de músculo picado dieron valores significativamente distintos (tabla 4.4 b). En general, las medidas más altas se dieron en el lote de bacaladilla seguido del de merluza y del de bacalao. Los valores iniciales fueron similares a los observados por Careche y Tejada (1988) y Almandos y col. (1984) en músculo piado y filetes de merluza respectivamente. Sin embargo, Huidobro y Tejada (1992) detectaron niveles superiores en músculo picado bacaladilla conservada a  $-18^{\circ}\text{C}$ . En general, los niveles de DMA obtenidos en músculo picado de bacalao, merluza y bacaladilla a lo largo de todo el estudio están en el rango de los observados por Rehbein (1988) en músculo picado de estas mismas especies conservado a  $-8^{\circ}\text{C}$ . Este autor detectó diferencias entre bacalao, merluza y bacaladilla semejantes a las encontradas por nosotros a la anterior temperatura. A temperatura de conservación de  $-5^{\circ}\text{C}$ , Castell y col. (1971) observaron mayor producción de DMA en músculo de merluza que de bacalao.

En cuanto a la evolución a lo largo del tiempo, Crawford y col. (1979) estudiaron los cambios en DMA en músculo picado de merluza (*Merluccius productus*) y bacalao (*Gadus macrocephalus*) conservado a  $-25^{\circ}\text{C}$  y encontraron que en merluza los niveles de DMA se triplicaron al cabo de un año. Esto está de acuerdo con lo observado por nosotros en bacaladilla y merluza. En bacalao, sin embargo, dicho incremento fue más acusado.

Los resultados muestran el efecto del grado de integridad del músculo sobre la formación de DMA. Las diferencias observadas entre ambos lotes de bacalao están de acuerdo con los resultados obtenidos en proteína soluble (apartado 4.2.1.), que ponían de manifiesto un deterioro más acentuado del músculo picado. Por otro lado, se encontró correlación significativa entre los valores de DMA y las distintas propiedades funcionales estudiadas en músculo (solubilidad proteica,  $\eta_{ap}$  de homogeneizado y resistencia a la cizalladura) en todos los lotes (tablas 4.7., 4.8., 4.9. y 4.10.). Estas correlaciones fueron más significativas en los lotes de merluza y bacaladilla. Careche y Tejada (1988) también observaron correlación significativa entre propiedades funcionales (solubilidad proteica y  $\eta_{ap}$  de homogeneizado) y niveles de DMA en músculo picado de merluza durante la conservación en congelación a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.4. FORMALDEHIDO (FA)

Muchos autores han descrito aumentos de FA libre durante la conservación de especies del género gadiformes en estado congelado (Babbitt y col., 1972; Owusu-Ansah y Hultin, 1986; LeBlanc y col., 1988) así como la existencia de correlación entre FA libre y DMA (Babbitt y col., 1972; Mackie y Thomson, 1974; Owusu-Ansah y Hultin, 1986; LeBlanc y col., 1988). Esto es lógico ya que ambos compuestos se producen equimolarmente a partir de la desmetilación enzimática del OTMA. Sin embargo, para detectar la actividad de la OTMA desmetilasa se suele utilizar la medida de la DMA en lugar de medir el FA libre, ya que este reacciona rápidamente con muchos componentes del músculo (apartado 1.3.2.2.). Por lo tanto, la medida simultánea de FA y DMA es una estimación aproximada de la cantidad de FA que ha reaccionado y puede estar relacionada con el deterioro de las proteínas miofibrilares.

Los resultados obtenidos para el contenido en FA libre de los distintos lotes se representan en la figura 4.4. Se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al factor tiempo en todos los lotes (tablas 4.5 a y b).

Los lotes de filetes y músculo picado de bacalao mostraron diferencias significativas

# FORMALDEHIDO (FA)

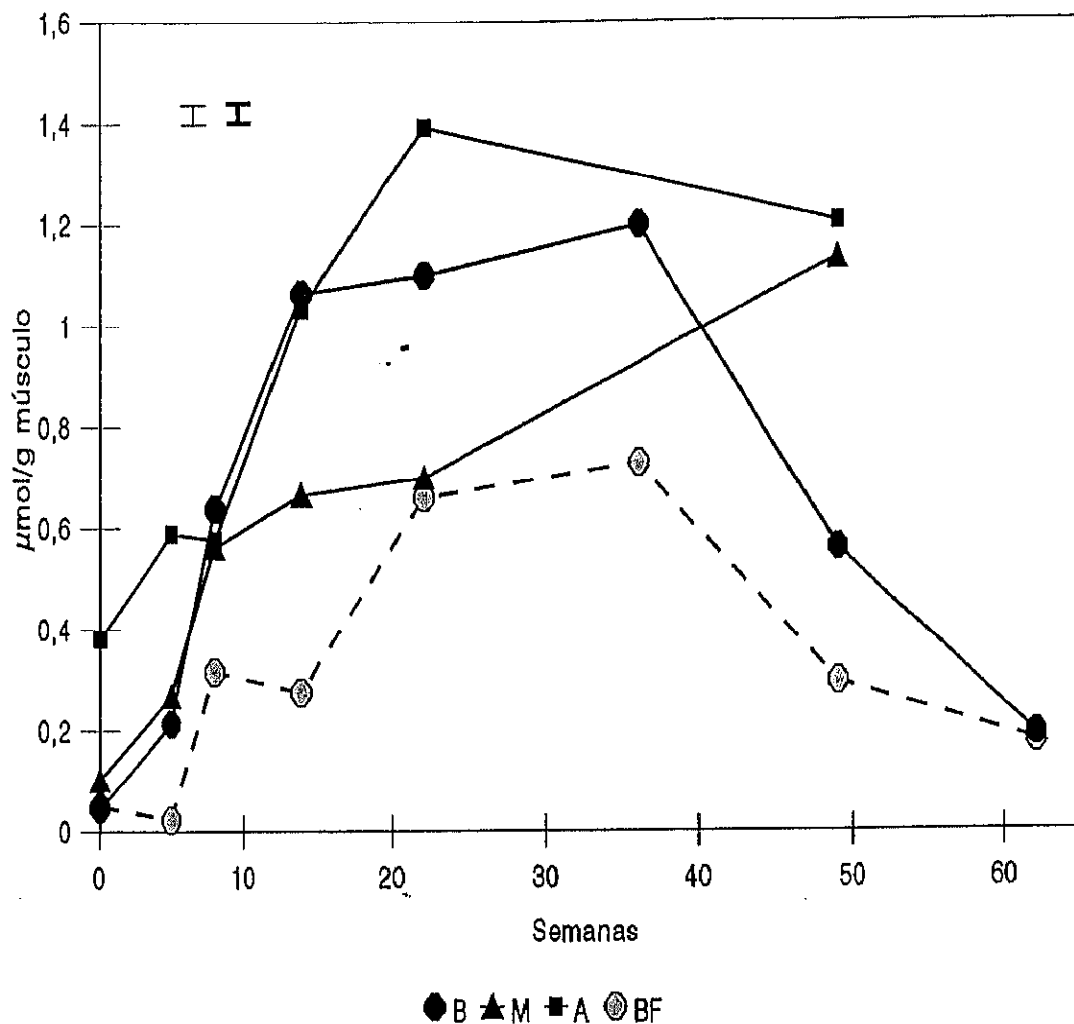


Figura 4.4.- Evolución de los niveles de formaldehído libre (FA) ( $\mu$ moles/g músculo) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  en los lotes de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A).

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
FA	***	***	***

Tabla 4.5. a – Análisis de la varianza correspondiente a la medida de formaldehído (FA, en  $\mu$ moles de FA/g músculo) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
FA	***	***	***

Tabla 4.5. b – Análisis de la varianza correspondiente a la medida de formaldehído (FA, en  $\mu$ moles de FA/g músculo) de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y de la especie.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

(tabla 4.5 a), siendo el FA libre mucho menor en filetes que en músculo picado durante el periodo de conservación. Esto podría explicarse por la mayor actividad de la OTMAasa en músculo picado (apartados 1.3.2. y 4.1.3) y no a la mayor reactividad del FA en filetes, ya que las diferencias en cantidad de FA unido (DMA – FA libre) entre ambos lotes no fueron importantes.

También se encontraron diferencias significativas entre los tres lotes de músculo picado (tabla 4.5 b). Se observó que los valores de FA libre detectados en bacaladilla fueron superiores hasta la semana 5 de conservación. Posteriormente, bacalao y bacaladilla alcanzaron niveles similares y superiores a merluza. En la semana 49 (control final) la merluza alcanzó su valor máximo de FA libre, igualando así a lo encontrado en bacaladilla en el mismo control. Los máximos alcanzados, así como los incrementos totales en FA libre encontrados fueron similares en los tres lotes. Los valores detectados en merluza fueron superiores a los observados por González (1991) para filetes de dicha especie conservados a la misma temperatura. Esto podría explicarse por el efecto, anteriormente comentado, del picado sobre la formación de FA (Mackie y Thomson, 1974; Babbitt y col., 1972; Hiltz, 1976; Dingle, 1978; Crawford y col., 1979). En bacaladilla, estos fueron inferiores a los que encontraron Huidobro y Tejada en dicha especie conservada a  $-18^{\circ}\text{C}$  (Huidobro y Tejada, 1992). Rehbein (1988) detectó en músculo picado de las tres especies conservadas a  $-8^{\circ}\text{C}$  cantidades de FA libre bastante inferiores a las encontradas en nuestro estudio, aún cuando los valores de DMA fueron similares. Esto podría deberse a una mayor reacción del FA con las proteínas del músculo cuando la temperatura de conservación en congelación es más alta.

Se encontró una correlación significativa entre los valores de FA y DMA en todos los lotes (tablas 4.7., 4.8., 4.9. y 4.10.), lo que, como ya se ha indicado, confirma lo que ya ha sido observado por diversos autores (Babbitt y col., 1972; Mackie y Thomson, 1974; Owusu-Ansah y Hultin, 1986; LeBlanc y col., 1988).

Para estudiar la cantidad de FA que ha reaccionado con otros componentes del músculo y no se detecta como FA libre se compararon los valores de DMA y FA libre obtenidos. A partir de la semana 22 en bacalao y de la semana 36 en merluza y bacaladilla se empezaron

a detectar diferencias entre los valores de DMA y FA libre, siendo los primeros superiores. Esto indica que parte de el FA formado por la acción de la OTMA desmetilasa quedó unido a las proteínas o a compuestos nitrogenados<sup>d</sup> no proteicos (Banda y Hultin, 1983; Owusu-Ansah y Hultin, 1987), no siendo detectado como FA libre. Este proceso parece que fue más rápido en merluza y bacaladilla que en bacalao. Los valores finales de FA unido (DMA – FA libre) fueron superiores en bacaladilla, seguida de merluza, músculo picado de bacalo y filetes de bacalao en orden decreciente. Sin embargo, estas diferencias podrían no ser significativas ya hay que tener en cuenta que la distinta sensibilidad entre las técnicas de medida de DMA y FA libre podrían influir en la determinación del FA unido (Kelleher y col., 1981). El descenso en los niveles de FA en los últimos controles, detectado en ambos lotes de bacalao, se puede explicar también por su interacción con proteínas u otros componentes musculares de manera irreversible en las etapas más avanzadas de degradación proteica (apartado 1.3.2.2.). Esto está de acuerdo con algunos autores que encontraron evidencia de la mayor reacción del FA con proteínas ya desnaturalizadas (Ang y Hultin, 1989; Sotelo y Mackie, 1993). Así, a medida que aumenta el periodo de conservación también lo hacen los cambios en las proteínas y la reactividad del FA. Sin embargo, el aumento de la cantidad de FA unido observado puede atribuirse también a los cambios en la integridad de las membranas celulares que se producen a lo largo de la conservación, los cuales favorecen la liberación del FA y su mayor acceso a las proteínas (apartado 1.3.). Por otro lado, la mayor cantidad de FA producido podría influir en su mayor reactividad al aumentar la relación FA/proteína (Sotelo y col., 1995).

#### 4.2.5.- MEDIDA INSTRUMENTAL DE TEXTURA (KRAMER)

La modificación de las proteínas miofibrilares durante la conservación en congelación se manifiesta también en variaciones en textura. La medida de la resistencia a la cizalladura por medio de la célula de Kramer permite cuantificar estas variaciones (Borderías y col., 1983). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.5. El análisis estadístico correspondiente se muestra en las tablas 4.6. a y 4.6. b. En la figura 4.5. se aprecia un aumento significativo con el tiempo de conservación en todos los lotes.

## RESISTENCIA A LA CIZALLADURA (KRAMER)

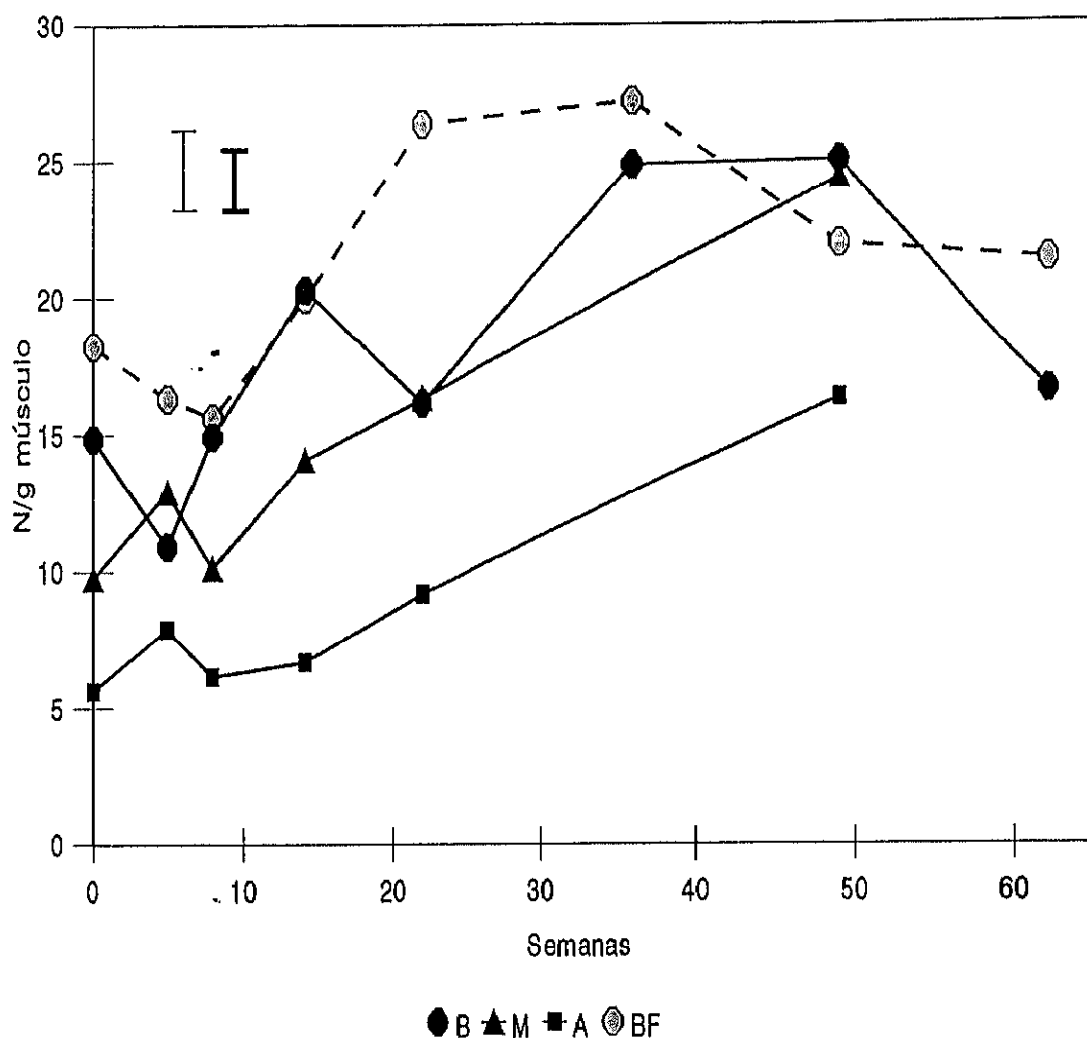


Figura 4.5.- Evolución de la resistencia a la cizalladura (Kramer) (N/g músculo) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  en los lotes de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A).

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
Kramer	***	***	***

Tabla 4.6. a – Análisis de la varianza correspondiente a la medida de resistencia a la cizalladura (Kramer, en N/g músculo) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
Kramer	***	***	***

Tabla 4.6. b – Análisis de la varianza correspondiente a la medida de resistencia a la cizalladura (Kramer, en N/g músculo) de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y de la especie.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

– = Efecto no significativo



Las diferencias observadas entre los lotes de músculo picado y filetes de bacalao únicamente fueron estadísticamente significativas en las semanas 5 y 22 de conservación. En ambos lotes aumentó la resistencia a la cizalladura, seguido de una disminución en las etapas finales de la conservación, debido probablemente a la modificación detectada en el músculo incluso visualmente, consistente en una pérdida de cohesión que hizo que la muestra pasara más fácilmente a través de las ranuras de la célula aun cuando su dureza fuese mayor.

En la semana 14 en merluza y 22 en bacaladilla comenzaron a observarse valores significativamente superiores a los iniciales. La tendencia a aumentar observada en estos lotes, a diferencia de músculo picado de bacalao, duró hasta el final de la conservación, acentuándose en el último control. El incremento observado a lo largo del tiempo fue mayor y más lineal en estas dos especies que en bacalao.

Al comparar los tres lotes de músculo picado se encontraron en bacalao y merluza valores significativamente superiores a los de bacaladilla (tabla 4.6 b), esto podría ser debido a que la bacaladilla presenta una textura bastante blanda cuando se encuentra en periodo posterior al desove (Ofstad y col., 1992). Huidobro (1990) ha descrito valores más bajos en comparación con lo observado en otras especies no pertenecientes al orden gadiformes, que, como ya se ha indicado, sufren menos cambios en textura durante la conservación por congelación y atribuyó esta diferencia a las características intrínsecas de la especie. En cuanto al lote de merluza, los datos observados se asemanan bastante a los detectados por Careche (1988) en músculo picado de esta especie conservado a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

En el presente trabajo se encontró correlación entre los valores resistencia a la cizalladura y DMA y FA libre en todos los lotes (tablas 4.7., 4.8., 4.9. y 4.10.). Sin embargo, las diferencias en cantidad de DMA formada no se corresponden con las diferencias observadas en textura, esto sugiere que en la medida instrumental de textura por medio de la célula de Kramer pueden estar influyendo otros factores como el distinto tamaño de los miotomos del músculo en cada especie. Por lo tanto, considerando los cambios en cada especie por separado, los resultados sugieren que la cantidad de DMA (o FA) formado está relacionada con el endurecimiento observado a lo largo del tiempo de conservación.

	$\eta_{ap}$	FA	SOL/TOT	KRAMER	DMA
$\eta_{ap}$	1				
FA	*	1			
SOL/TOT	***	–	1		
KRAMER	–	**	–	1	
DMA	**	**	*	***	1

Tabla 4.7.– Músculo picado de bacalao (B) (–20°C). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre músculo.  $\eta_{ap}$ : Viscosidad de homogeneizado de músculo; FA: Formaldehído; SOL/TOT: Proteína soluble frente a total; KRAMER: Resistencia a la cizalladura; DMA: Dimetilamina

	$\eta_{ap}$	FA	SOL/TOT	KRAMER	DMA
$\eta_{ap}$	1				
FA	***	1			
SOL/TOT	**	–	1		
KRAMER	**	***	–	1	
DMA	**	*	**	*	1

Tabla 4.8.– Filetes de bacalao (BF) (–20°C). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre músculo.  $\eta_{ap}$ : Viscosidad aparente de músculo; FA: Formaldehído; SOL/TOT: Proteína soluble frente a total; KRAMER: Resistencia a la cizalladura; DMA: Dimetilamina.

Nivel de significación de la correlación: \*\*\* = significativa a  $p < 0.001$ ; \*\* = significativa a  $p < 0.01$ ; \* = significativa a  $p < 0.05$ ; – = no significativa

	$\eta_{ap}$	FA	SOL/TOT	KRAMER	DMA
$\eta_{ap}$	1				
FA	***	1			
SOL/TOT	***	***	1		
KRAMER	***	***	***	1	
DMA	***	***	***	***	1

Tabla 4.9.- Músculo picado de merluza (M) ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre músculo.  $\eta_{ap}$ : Viscosidad aparente de músculo; FA: Formaldehído; SOL/TOT: Proteína soluble frente a total; KRAMER: Resistencia a la cizalladura; DMA: Dimetilamina.

	$\eta_{ap}$	FA	SOL/TOT	KRAMER	DMA
$\eta_{ap}$	1				
FA	***	1			
SOL/TOT	***	***	1		
KRAMER	***	***	***	1	
DMA	***	***	***	***	1

Tabla 4.10.- Músculo picado de bacaladilla (A) ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre músculo.  $\eta_{ap}$ : Viscosidad aparente de músculo; FA: Formaldehído; SOL/TOT: Proteína soluble frente a total; KRAMER: Resistencia a la cizalladura; DMA: Dimetilamina.

Nivel de significación de la correlación: \*\*\* = significativa a  $p < 0.001$ ; \*\* = significativa a  $p < 0.01$ ; \* = significativa a  $p < 0.05$ ; - = no significativa

No se encontraron diferencias por efecto del picado en bacalao, aún cuando los niveles de DMA fueron mayores en el último. Esto se correspondería con la escasa diferencia en cantidad de FA unido detectada en ambos lotes (apartado 4.2.1.), aunque también podría atribuirse a que, en las condiciones de preparación de la muestra (3.2.2.1.), el menor grado de integridad de la misma disminuya el valor de la medida de textura.

#### **4.3.- ESTUDIO DE EXTRACTABILIDAD DE PROTEINAS MIOFIBRILARES DE MUSCULO**

Como ya se ha comentado en el apartado 4.2.1., la pérdida de extractabilidad de las proteínas del músculo durante la conservación por congelación se considera un parámetro indicativo del grado de desnaturalización y agregación de las mismas. Dentro de las proteínas mayoritarias del músculo, las proteínas sarcoplásmicas no se modifican apenas, mientras que las miofibrilares y del estroma son las principales responsables de la agregación durante la conservación en congelación (Huidobro y Tejada, 1993 b).

Para estudiar la agregación de las proteínas miofibrilares y su influencia en los cambios en los cambios observados en la funcionalidad del músculo, se midió la extractabilidad de estas proteínas en cada control a lo largo de la conservación. La extracción se llevó a cabo con solución salina de alta fuerza iónica (NaCl 0,6 M) y pH 7 (según la técnica indicada en el apartado 3.2.3.1.), condiciones a las cuales se alcanza un máximo de extractabilidad de proteínas miofibrilares (Kawashima y col., 1973; Stefansson y Hultin, 1994).

Un objetivo de este trabajo es el estudio de la proteína agregada no extraíble en NaCl 0,6 M detectada durante la conservación del músculo en congelación (apartado 3.2.1.). En este apartado se comentarán los resultados obtenidos del tratamiento de estos agregados con distintos agentes: SDS y SDS +  $\beta$ -ME. Este tratamiento estaba encaminado a estudiar la naturaleza de los enlaces implicados en dicha agregación y la evolución de los mismos a lo largo del tiempo. Asimismo, se trató de dilucidar la influencia del grado de integridad del

músculo y la especie en la agregación.

... La proteína agregada no extraída con solución salina (P1) se trató según el esquema descrito en el apartado 3.2.3.2. Al tratar el agregado con SDS 2% se extrajo una fracción de proteína extraída (S2), que estaba unida en el agregado en gran proporción por medio de interacciones secundarias, ya que el SDS es un detergente capaz de romper o debilitar este tipo de enlaces (Roussel y Cheftel, 1990; Edelstein, 1991 a) y una fracción no extraída (P2). Esta última se sometió a su vez a la acción combinada de SDS 2% más  $\beta$ -ME al 5%, siendo este último un agente reductor que rompe los puentes disulfuro (Edelstein, 1991 b). De esta manera se obtuvo una fracción de proteína extraída (S3) que estaba unida al agregado en parte por uniones S-S e interacciones secundarias y una fracción no extraída (P3). Este se consideró formado en su mayor parte por enlaces covalentes distintos de los puentes disulfuro.

Hay que tener en cuenta que cualquiera de las fracciones extraídas (S1, S2 y S3) podrían contener agregados solubles, formados por el establecimiento de enlaces interproteicos, que no se rompen en las condiciones empleadas en cada tratamiento (enlaces secundarios, S-S y covalentes no S-S, en la fracción S1; S-S y covalentes no S-S, en la fracción S2 y covalentes no S-S, en la fracción S3 y cuyo peso molecular no es lo suficientemente grande como para quedar formando parte de la fracción no extraída al centrifugar.

Debido al gran número de parámetros que se han de considerar en conjunto, para una mayor claridad en la exposición se han expresado los resultados de tres maneras diferentes:

a) Cantidad de proteína extraída en las fracciones S1, S2, S3 y P3, estudiando en cada fracción por separado el efecto del tratamiento y especie (figuras 4.6., 4.7., 4.9., 4.11.).

b) Proporción de proteína del agregado P1 extraída en las anteriores fracciones, estudiando en cada fracción por separado el efecto del tratamiento y especie (figuras 4.8., 4.10., 4.12.).

c) Relación entre las fracciones S1, S2 y S3 y P3, estudiando cada lote por separado (figuras 4.13., 4.14., 4.15., 4.16.).

	$\eta_{ap}$	FA	SOL/TOT	KRAMER	DMA
$\eta_{ap}$	1				
FA	***	1			
SOL/TOT	***	***	1		
KRAMER	***	***	***	1	
DMA	***	***	***	***	1

Tabla 4.9.- Músculo picado de merluza (M) (-20°C). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre músculo.  $\eta_{ap}$ : Viscosidad aparente de músculo; FA: Formaldehído; SOL/TOT: Proteína soluble frente a total; KRAMER: Resistencia a la cizalladura; DMA: Dimetilamina.

	$\eta_{ap}$	FA	SOL/TOT	KRAMER	DMA
$\eta_{ap}$	1				
FA	***	1			
SOL/TOT	***	***	1		
KRAMER	***	***	***	1	
DMA	***	***	***	***	1

Tabla 4.10.- Músculo picado de bacaladilla (A) (-20°C). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre músculo.  $\eta_{ap}$ : Viscosidad aparente de músculo; FA: Formaldehído; SOL/TOT: Proteína soluble frente a total; KRAMER: Resistencia a la cizalladura; DMA: Dimetilamina.

Nivel de significación de la correlación: \*\*\* = significativa a  $p < 0.001$ ; \*\* = significativa a  $p < 0.01$ ; \* = significativa a  $p < 0.05$ ; - = no significativa

	$\eta_{ap}$	FA	SOL/TOT	KRAMER	DMA
$\eta_{ap}$	1				
FA	*	1			
SOL/TOT	***	-	1		
KRAMER	-	**	-	1	
DMA	**	**	*	***	1

Tabla 4.7.- Músculo picado de bacalao (B) (-20°C). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre músculo.  $\eta_{ap}$ : Viscosidad de homogeneizado de músculo; FA: Formaldehído; SOL/TOT: Proteína soluble frente a total; KRAMER: Resistencia a la cizalladura; DMA: Dimetilamina

	$\eta_{ap}$	FA	SOL/TOT	KRAMER	DMA
$\eta_{ap}$	1				
FA	***	1			
SOL/TOT	**	-	1		
KRAMER	**	***	-	1	
DMA	**	*	**	*	1

Tabla 4.8.- Filetes de bacalao (BF) (-20°C). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre músculo.  $\eta_{ap}$ : Viscosidad aparente de músculo; FA: Formaldehído; SOL/TOT: Proteína soluble frente a total; KRAMER: Resistencia a la cizalladura; DMA: Dimetilamina.

Nivel de significación de la correlación: \*\*\* = significativa a  $p < 0.001$ ; \*\* = significativa a  $p < 0.01$ ; \* = significativa a  $p < 0.05$ ; - = no significativa

Cada una de las formas de expresión resalta una información que de otra forma quedaría enmascarada. En a y b se comparan los resultados obtenidos en cada lote, tanto considerando la magnitud total de la agregación (a) como independientemente de esta (b). Esto permite comparar los cambios en los distintos lotes desde el punto de vista de la funcionalidad de músculo y del tipo de agregado formado. En c) se obtiene una visión global de la naturaleza de la agregación en cada lote, resaltando las relaciones entre los cambios observados en las distintas fracciones obtenidas del tratamiento del agregado (S2, S3 y P3).

#### **4.3.1.- EXTRACTABILIDAD DE ACTOMIOSINA NATURAL (AMN) EN NaCl 0,6 M (S1)**

En la figura 4.6. se muestran los cambios en extractabilidad de AMN expresada en gramos de AMN por gramo de proteína del músculo. Se observa que tuvo lugar una disminución gradual en todos los lotes a lo largo de la conservación.

Hasta después de la semana 22 no se encontraron diferencias entre músculo picado y filetes de bacalao. En el primero tuvo lugar un descenso muy acusado que comenzó en la semana 22 y que continuó hasta la semana 49, alcanzando al final de la conservación los valores menores de extractabilidad detectados este estudio. El efecto del picado disminuyó la extractabilidad de la proteína miofibrilar, de forma similar que la extractabilidad de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares (proteína soluble, figura 4.1.), aunque en esta última las diferencias se observaron más tempranamente.

El lote de bacalao presentó inicialmente valores más altos de extractabilidad que las otras dos especies, pero a partir de la semana 22 experimentó un descenso, como ya se ha comentado, de tal manera que en la semana 49 alcanzó valores inferiores incluso a los de la merluza y bacaladilla. En músculo picado de bacaladilla se obtuvieron valores ligeramente más bajos que en merluza, pero la disminución de la extractabilidad fue similar y lineal en ambas especies.



## EXTRACTABILIDAD S1 (0.6 NaCl)

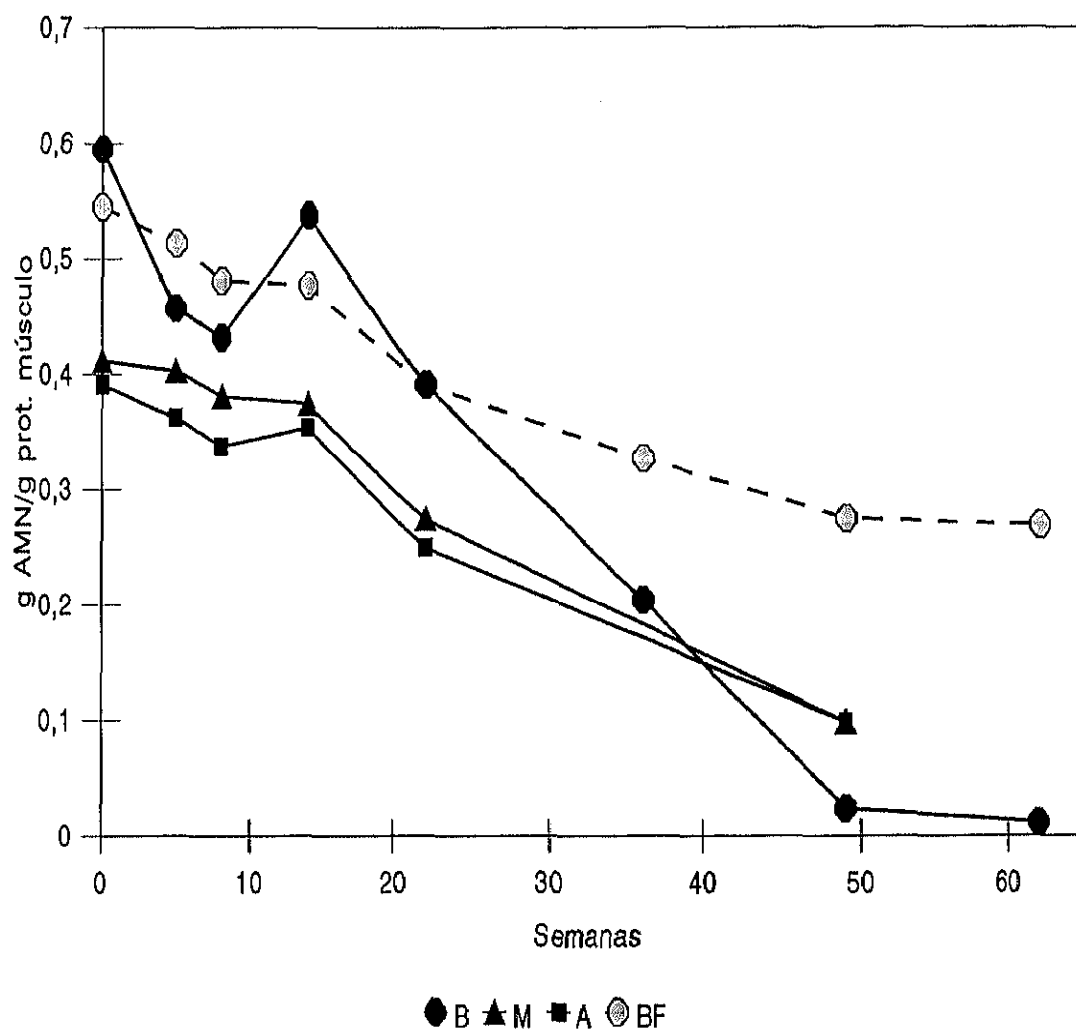


Figura 4.6.- Evolución de la extractabilidad en NaCl 0,6 M de la actomiosina natural (AMN) de músculo (g prot. extraída/g prot. músculo) en los lotes de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En general, en extractabilidad de proteínas miofibrilares se observaron diferencias entre los lotes de bacalao y los de merluza y bacaladilla y entre picado y filetes de bacalao. Estas diferencias entre lotes fueron similares a las que se dieron en  $\eta_{ap}$  de músculo (apartado 4.2.1.). Hay que tener en cuenta que en la técnica de  $\eta_{ap}$  de músculo la medida se realiza sobre los homogeneizados de músculo previamente filtrados (apartado 3.2.2.1.). Cuando la proteína está muy agregada, parte de esta podría quedar retenida en este paso, con lo que la concentración del filtrado sobre el que se realiza la medida sería menor cuanto más agregada esté la proteína del músculo. Por otro lado, las proteínas miofibrilares son las que contribuyen mayormente en la medida de la  $\eta_{ap}$  (Borderías y col., 1985, Huidobro y Tejada, 1993 b). Los cambios en agregación de la AMN y, en consecuencia, en su concentración en dichos filtrados, influye grandemente en la medida de la  $\eta_{ap}$ . Todo ello confirma la influencia de los cambios en extractabilidad en la medida de la  $\eta_{ap}$  de músculo.

Sin embargo, la  $\eta_{ap}$  experimentó en la semana 22 una brusca disminución, mientras que el descenso observado en extractabilidad fue gradual hasta la semana 49. Esto indica que a pesar de la influencia de los cambios en extractabilidad en la  $\eta_{ap}$  de músculo, existen estados incipientes de desnaturalización y agregación que son detectados antes por cambios en  $\eta_{ap}$  que por modificaciones en solubilidad (Tejada y Careche, 1988 y Careche y Tejada, 1990 a y b).

Sin embargo, las diferencias observadas entre los distintos lotes no se corresponden con las detectadas en textura (figura 4.5.), aún cuando se produjo un incremento de la dureza en todos los lotes. Esto podría deberse a que, como ya se ha indicado en el apartado 4.2.5., en la medida instrumental de textura por medio de la célula de Kramer pueden estar influyendo otros factores como el distinto tamaño de los miotomos del músculo en cada especie.

#### **4.3.2.- EXTRACTABILIDAD EN SDS 2% (S2) DEL AGREGADO PROTEICO NO EXTRAIDO EN NaCl 0,6 M (P1)**

En la figura 4.7. se muestra la extractabilidad de la proteína del agregado P1 cuando se trata con SDS 2% expresada como g de proteína extraída por g de proteína de músculo.

## EXTRACTABILIDAD S2 (2%SDS)

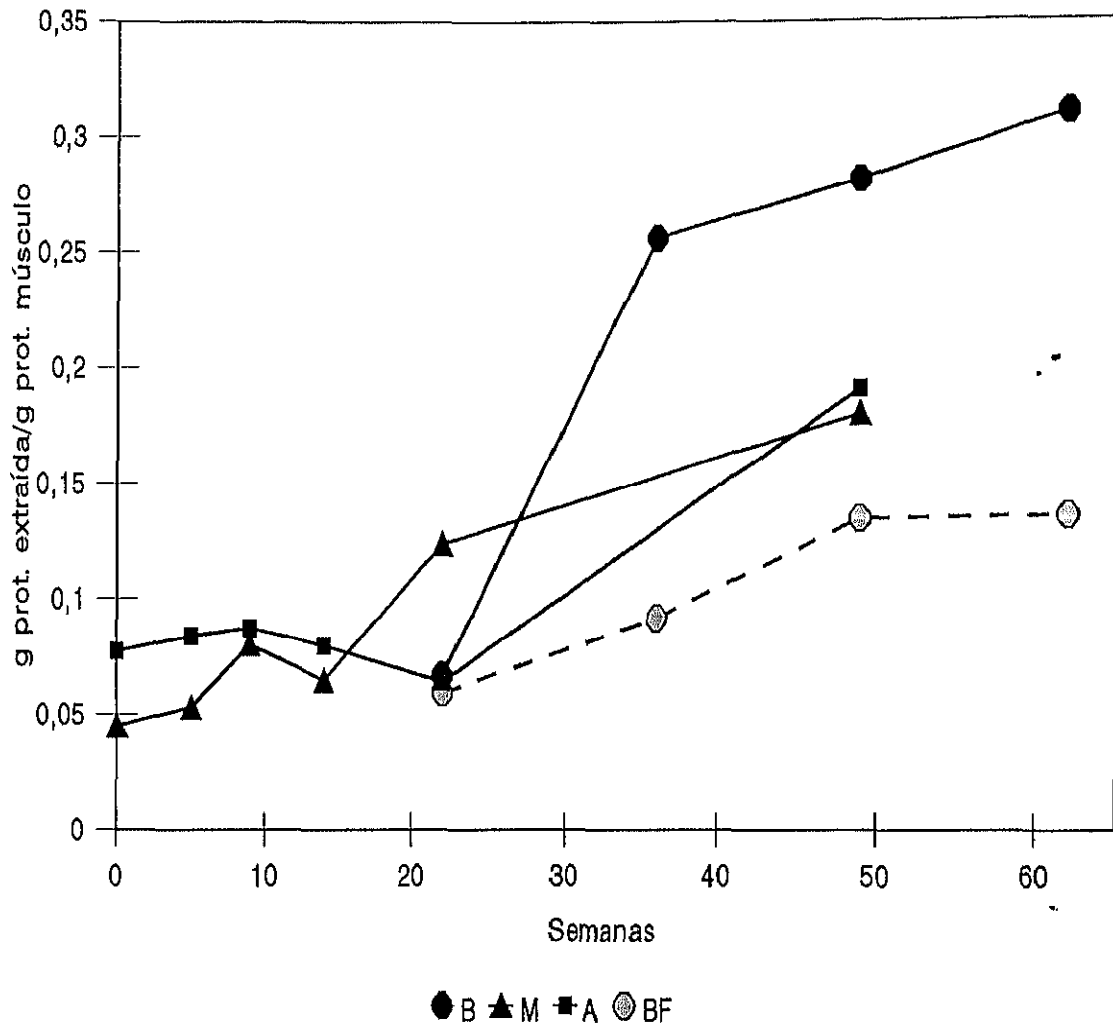


Figura 4.7.- Evolución de la extractabilidad en SDS 2% del agregado no extraído en 0,6 M NaCl (P1) (g prot. extraída/g prot. músculo) en los lotes de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se observa que hasta la semana 22 no se empezó a detectar en bacalao la presencia de agregados en cantidad significativa. Como se puede observar, los valores de extractabilidad a los cuales se empieza a detectar agregado en músculo picado de bacalao coinciden con los que presentaron los lotes de músculo picado de merluza y bacaladilla inicialmente.

En todos los lotes se produjo un aumento de la cantidad de proteína extraída con SDS 2% conforme avanza el tiempo de conservación, que guarda relación con la mayor cantidad de precipitado obtenido. Estos resultados confirman lo encontrado por Connell (1975), Laird y col. (1980), Owusu-Ansah y Hultin (1986) y Lim y Haard (1984) que indicaron una participación importante de las uniones secundarias en la agregación observada durante la conservación en congelación.

La cantidad de proteína extraída en SDS 2% fue mayor en músculo picado que en filetes de bacalo, aunque inicialmente (semana 22) estos fueron similares.

El efecto de la especie se estudió comparando los lotes de músculo picado de merluza y bacaladilla, ya que en bacalao no se detectó la aparición de precipitado insoluble en sal (P1) hasta la semana 22 de conservación. En bacaladilla se observaron valores más elevados que en merluza hasta la semana 22, pero al final de la conservación la cantidad de proteína extraída con SDS 2% fue parecida en ambos lotes. En merluza los valores comenzaron a aumentar en la semana 8 de conservación, mientras que en bacaladilla no se observó aumento hasta la semana 49.

Hay que tener en cuenta que la cantidad de proteína extraída en la fracción S2 depende de la cantidad de agregado P1 que se forme. Por tanto, para estudiar los cambios en el grado de participación de los enlaces secundarios en el agregado insoluble en sal P1, en la figura 4.8. se representa la extractabilidad de P1 con SDS 2% expresada en porcentaje de proteína de P1 que se solubiliza en SDS 2%. En filetes de bacalao se obtuvieron valores superiores que en músculo picado de la misma especie. En ambos lotes se observó un descenso con el tiempo que fue más acusado en músculo picado. El descenso en la proporción de proteína de P1 extraída con SDS 2% no implica necesariamente un descenso en la participación de este

PORCENTAJE DE S2 RESPECTO A P1 (% S2/P1)  
(SDS 2%)

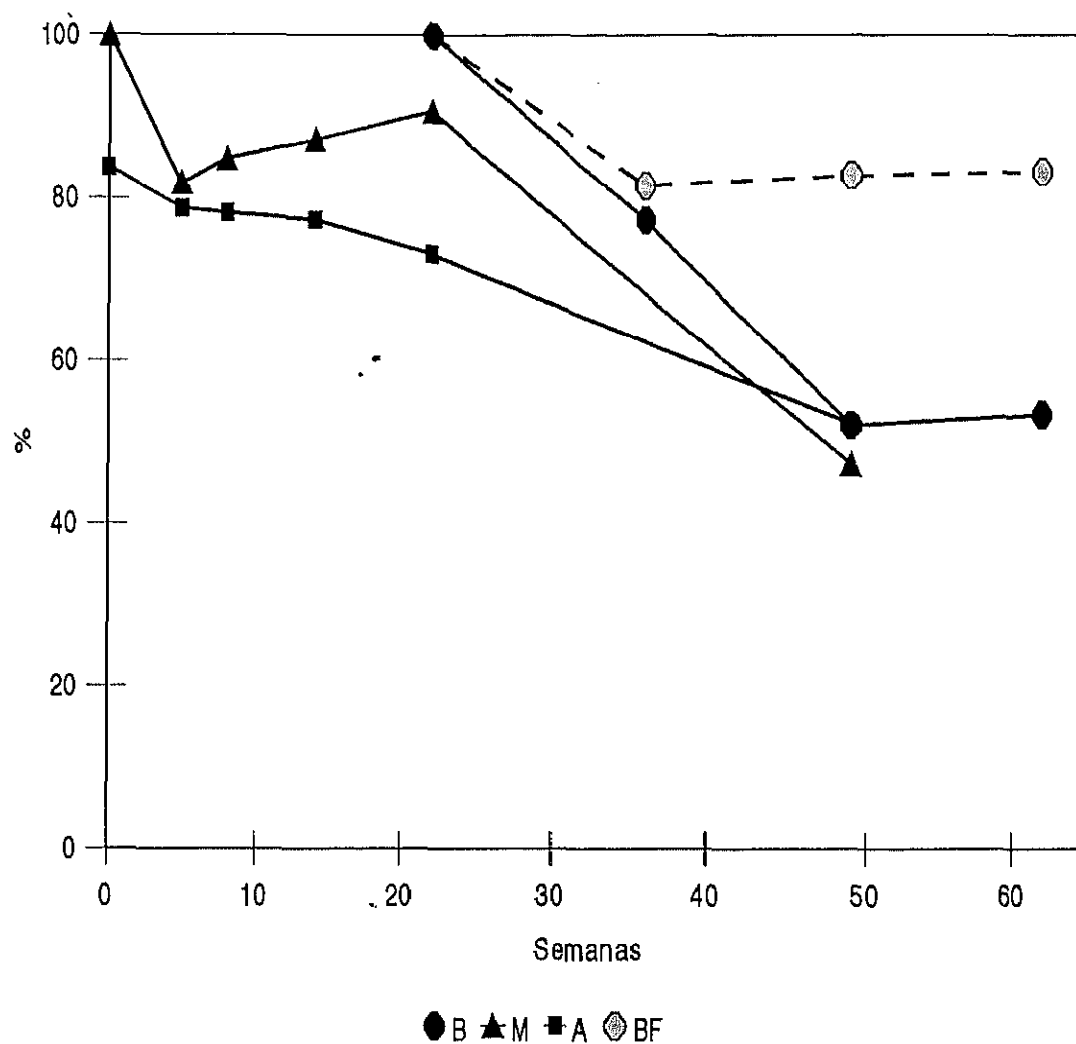


Figura 4.8.- Evolución del porcentaje de proteína extraída en SDS 2% (S2) respecto a P1 (proteína no extraída en NaCl 0,6 M) (% S2/P1) en los lotes de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

tipo de uniones en la agregación, ya que la formación de otro tipo de enlaces no rotos en las condiciones de extracción empleadas podría enmascarar dicha participación. Sin embargo, si se puede afirmar que los resultados ponen de manifiesto una tendencia al aumento en la proporción de los enlaces covalentes implicados en la agregación a lo largo de la conservación en ambos lotes, que fue más acusada en músculo picado.

En bacaladilla, la proporción de proteína extraída inicialmente en la fracción S2 fue inferior que en merluza. En esta última el agregado P1 se extrajo en su totalidad con SDS 2% al inicio de la conservación. En ambas especies se observó un descenso a lo largo de la conservación, aunque la cantidad total de proteína solubilizada en SDS 2% aumentó en el mismo periodo, como ya se ha indicado (figura 4.7.) (debido a una mayor formación de agregado insoluble en NaCl 0,6 M (figura 4.6.)). Al final de la conservación se observó una proporción de agregado extraído con SDS 2% similar en ambos lotes.

Por tanto, a pesar del aumento observado en la cantidad total de proteína en S2, la proporción de P1 extraída en dicha fracción tendió a disminuir en todos los lotes. La tendencia observada en la proporción de proteína de P1 solubilizada en la fracción S2 sugiere que en las etapas más avanzadas de la conservación tuvo lugar un aumento en la formación de otras uniones (S-S u otro tipo de covalentes), las cuales no se rompen con SDS 2% en las condiciones empleadas. En bacaladilla, a diferencia de las otras especies, dicha participación de uniones covalentes en el agregado se observó desde el inicio de la conservación. Sin embargo, en las etapas finales, esta fue similar en los lotes de músculo picado.

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo descrito por Owusu Ansah y Hultin (1986) en estudios de solubilidad de músculo de merluza picado conservado en congelación. Dichos autores detectaron una disminución en la proporción de proteína insoluble en sal que se solubiliza por acción del SDS, lo cual coincide con lo observado en el presente estudio. Así mismo, nuestros resultados están de acuerdo con la disminución en extractabilidad en 1% de SDS de músculo de bacalao muy deteriorado por conservación en congelación observada por Connell (1975).

#### 4.3.3.- EXTRACTABILIDAD EN SDS 2% + $\beta$ -ME 5% DEL AGREGADO PROTEICO NO EXTRAIDO EN SDS 2% (P2)

En la figura 4.9. se muestra la extractabilidad de P2 (insoluble en sal y en SDS 2%) en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (fracción S3) expresada como g de AMN por g de proteína de músculo.

Se observaron diferencias de extractabilidad entre el lote de músculo picado y filetes de bacalao, sobre todo a partir de la semana 49. En dicho control se observó un aumento pronunciado en músculo picado, mientras que en filetes no hubo cambios a lo largo del tiempo.

En bacalao, como ya se ha indicado, sólo se obtuvo P1 a partir de la semana 22. Por tanto, en dicho lote sólo se pudo estudiar la extractabilidad en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (fracción S3) a partir de dicho control. Por ello sólo es posible comparar los resultados de los lotes de músculo picado en las especies merluza y bacaladilla. En bacaladilla se observó un incremento en la semana 22, manteniéndose estable posteriormente, mientras que la merluza aumentó sólo en el último control, presentando niveles muy bajos hasta entonces. En este lote el agregado P1 obtenido al inicio de la conservación se extrajo totalmente con SDS 2%, con lo que no se obtuvieron fracciones P2, S3 y P3 en el control a las 0 semanas.

Como ya se indicó para la fracción S2, las cantidades de proteína extraídas dependen de la cantidad de P1. Por tanto, en la figura 4.10. se representa el porcentaje de proteína de P1 solubilizada con SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3). En bacalao, los cambios y las diferencias entre los lotes de músculo picado y filetes fueron similares a los observados en cantidad total de proteína extraída (figura 4.9.). La alta proporción de proteína extraída en S3 observada en músculo picado de bacalao a partir de la semana 49 parece indicar que el aumento en la agregación que tuvo lugar en las últimas semanas de conservación (figura 4.6.) fue debido en parte a la formación de enlaces S-S. Sin embargo, en filetes no se detectaron cambios a lo largo de la conservación.

# EXTRACTABILIDAD

## S3 (2%SDS+5%ME)

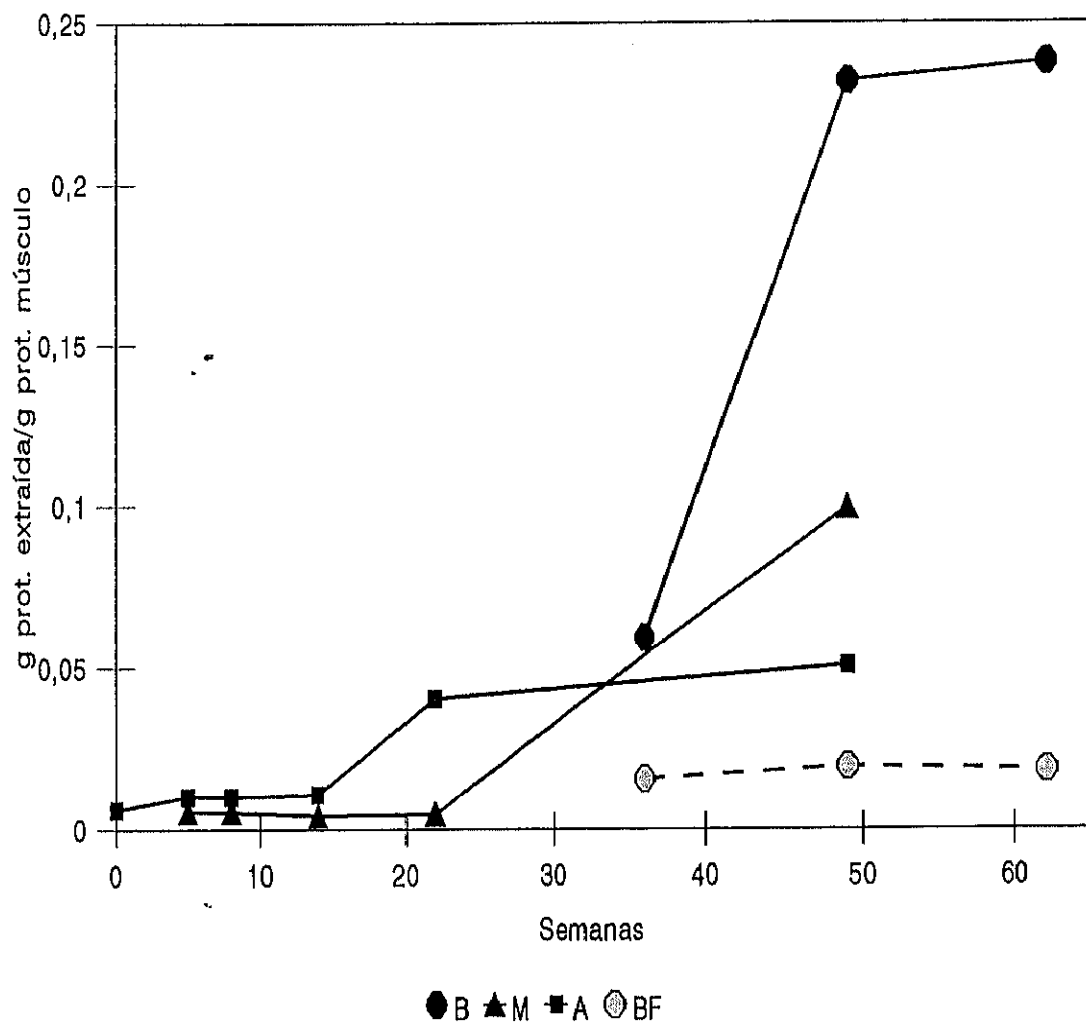


Figura 4.9.- Evolución de la extractabilidad en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) (g prot. extraída/g prot. músculo) en los lotes de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**PORCENTAJE DE S3 RESPECTO A P1 (% S3/P1)**  
(SDS 2% + ME 5%)

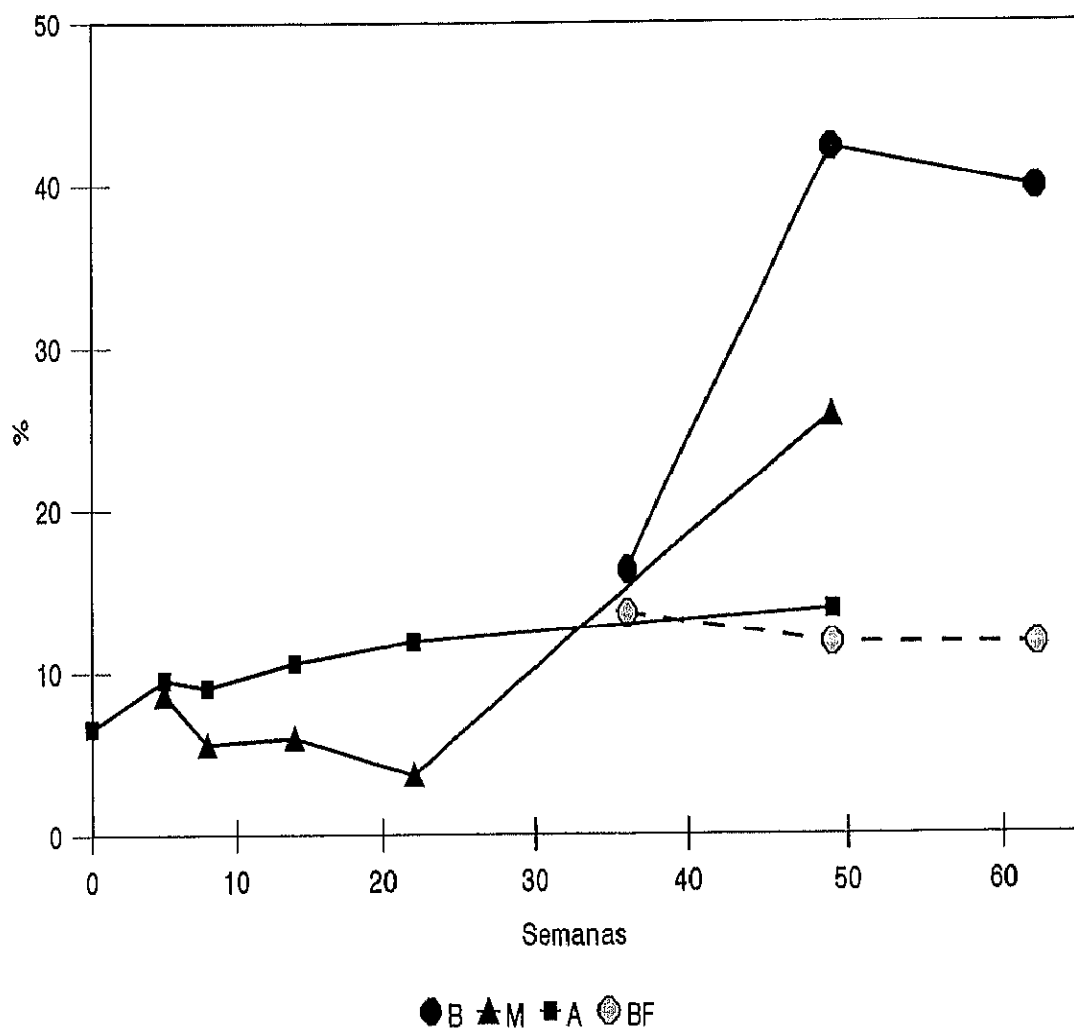


Figura 4.10.- Evolución del porcentaje de proteína extraída en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) respecto a P1 (proteína no extraída en NaCl 0,6 M) (% S3/P1) en los lotes de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Los valores en músculo picado de merluza aumentaron bruscamente al final de la conservación, indicando un incremento en la participación de los enlaces S-S en el agregado. En bacaladilla se observó un aumento más suave.

En general, estos resultados ponen de manifiesto la participación de las uniones S-S en el agregado formado durante la conservación en congelación en todos los lotes. Esto coincide con lo observado por otros autores (Matthews y col., 1980, Lim y Haard, 1984 y Owusu-Ansah y Hultin, 1986). También se puede inferir que hubo un aumento de la participación de las uniones S-S en las etapas finales de la conservación por congelación en músculo picado de bacalao y merluza. Esto ha sido observado por Lim y Haard (1984) en músculo picado de cglefino conservado a  $-10^{\circ}\text{C}$ . Dichos autores detectaron un aumento de más del 30% en la proporción de proteína del agregado extraída con SDS +  $\beta$ -ME. Owusu-Ansah y Hultin (1986) observaron también este incremento en la participación de enlaces S-S a lo largo de la conservación en congelación de filetes de merluza. Laird y Mackie (1979), sin embargo, encontraron que el  $\beta$ -ME no aumentaba la extractabilidad de agregado con respecto al tratamiento con SDS, pudiendo deberse a la diferente metodología empleada, ya que la centrifugación se realizó a 10.000 g, el doble de lo empleado en el presente estudio.

En músculo picado de bacaladilla y filetes de bacalao, el que la proporción de P1 extraída con SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% no cambie con el tiempo no implica que no hubo cambios en la participación de los enlaces S-S en la agregación, ya que dichos cambios pueden no ser detectados debido a la formación de otro tipo de enlaces covalentes no S-S que impedirían el acceso y ruptura de las uniones S-S por parte del  $\beta$ -ME.

#### **4.3.4.- PROTEINA NO EXTRAIDA CON EL TRATAMIENTO APLICADO (P3)**

En la figura 4.11. se representa la cantidad de proteína de P1 no extraída con el tratamiento aplicado expresada en gramos de proteína por gramo de proteína de músculo. Los valores observados en músculo picado de bacalao fueron ligeramente superiores a los de filetes de la misma especie. En músculo picado hubo un ligero aumento a lo largo del tiempo.

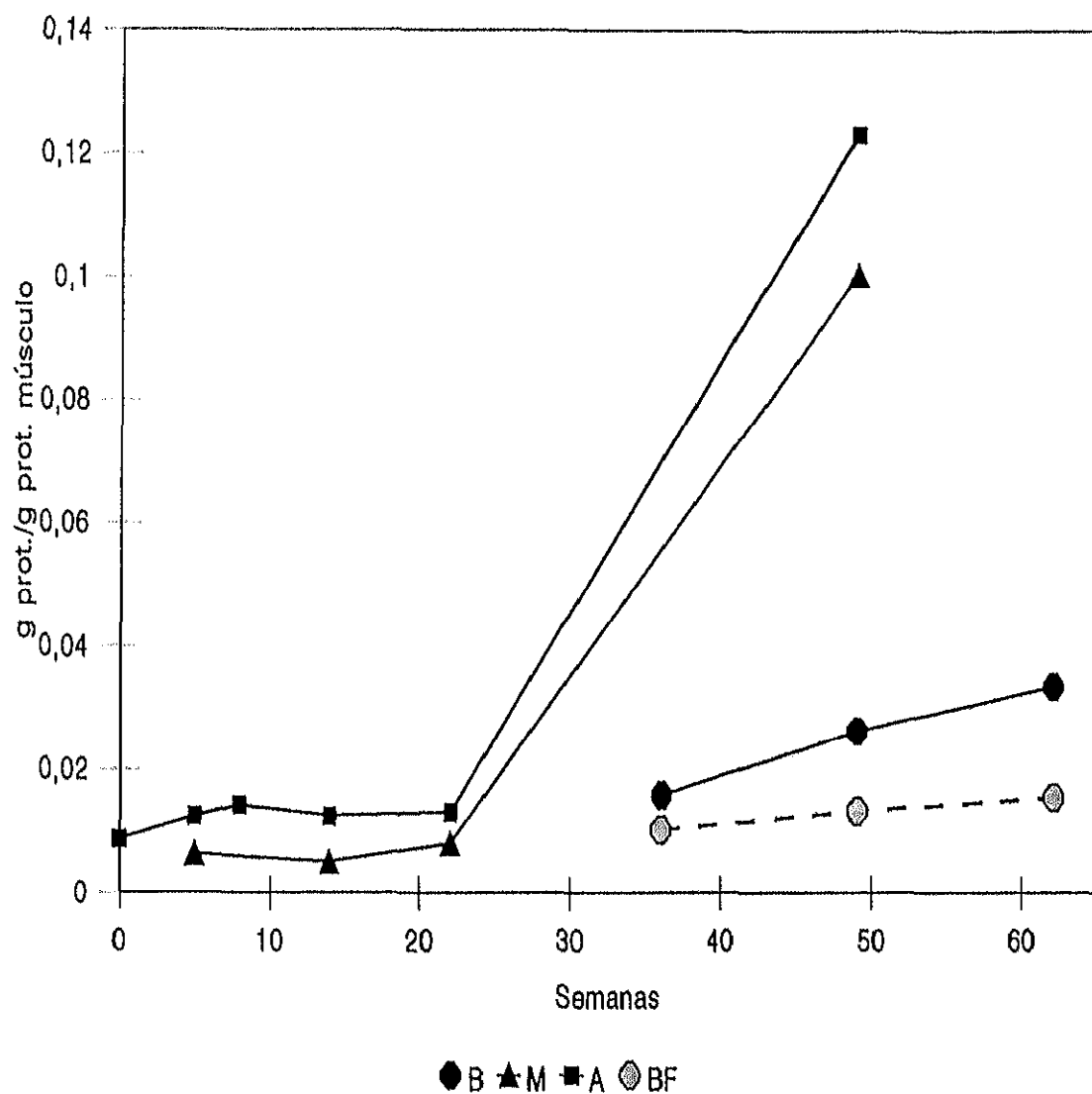


Figura 4.11.- Evolución de la cantidad de proteína no extraída (P3) (g prot. /g prot. músculo) en los lotes de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

# PORCENTAJE DE P3 RESPECTO A P1 (% P3/P1)

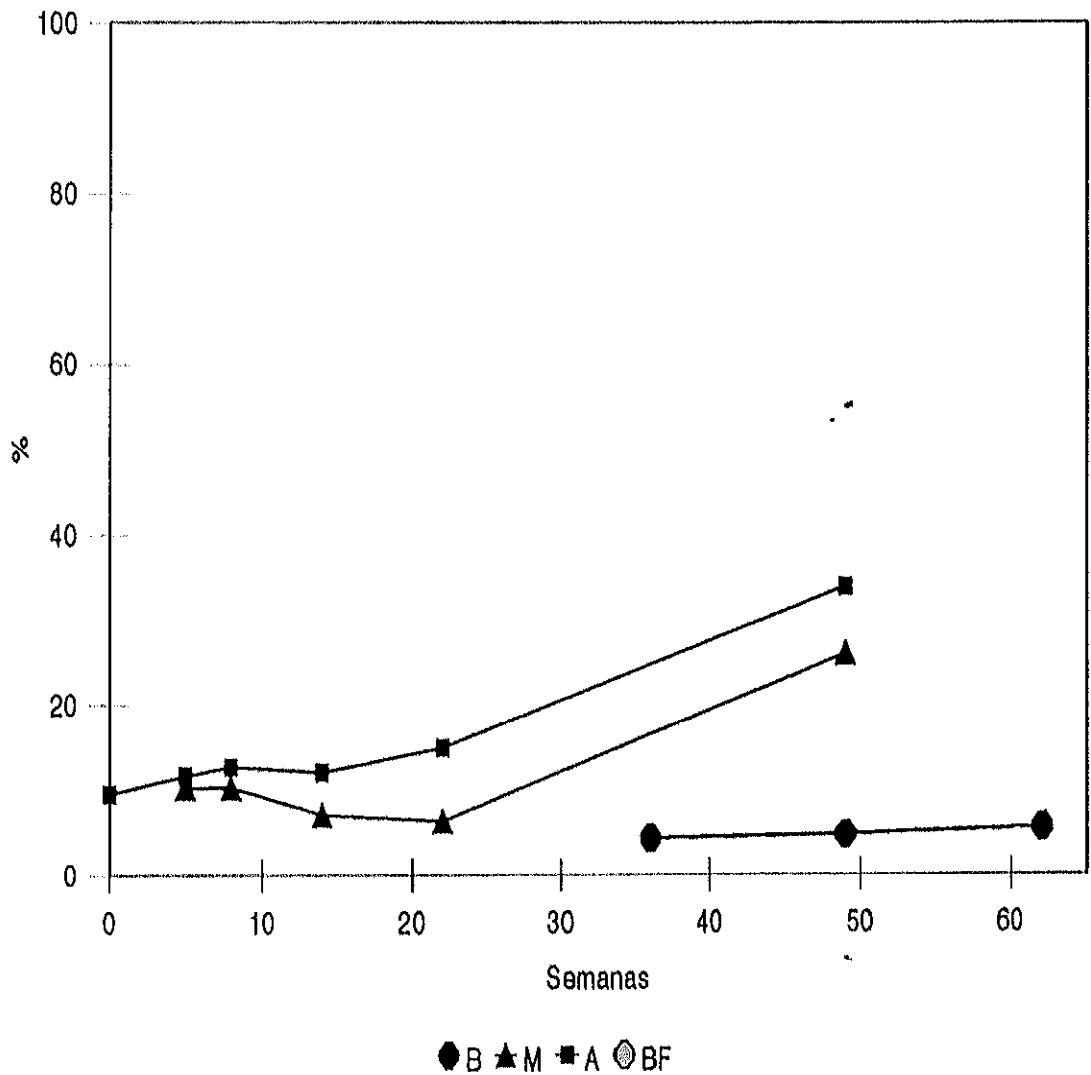


Figura 4.12.- Evolución del porcentaje de proteína no extraída (P3) respecto a P1 (proteína extraída en NaCl 0,6 M) (% P3/P1) en los lotes de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En músculo picado de merluza y bacaladilla se detectó un aumento muy pronunciado en el último control (semana 49), siendo los valores de esta última ligeramente superiores a lo largo de todo el periodo de conservación.

En la figura 4.12. se representan los cambios anteriores (figura 4.11.) expresados en porcentaje de proteína de P1 que no se pudo extraer. En dicha figura se observa como apenas si hubo cambios a lo largo del tiempo en los lotes de bacalao, indicando que la participación de los enlaces covalentes no disulfuro en P1 permaneció prácticamente constante durante el periodo de conservación.

Tanto en merluza como en bacaladilla cabe destacar el aumento en la proporción de proteína del agregado que no se extrae por el tratamiento aplicado (y por tanto de la participación de enlaces covalentes no S-S en la agregación) observado al final de la conservación. Hasta dicho control no se observaron cambios importantes en ambos lotes. En bacaladilla se observaron valores superiores a lo largo de todo el estudio.

#### 4.3.5.- NATURALEZA DE LA AGREGACION A LO LARGO DE LA CONSERVACION

En los apartados anteriores se han estudiado los valores de extractabilidad de P1 en los distintos lotes de manera comparativa para cada fracción obtenida (S2, S3 y P3). En dichos apartados se puso de manifiesto la indeterminación que supone la formación de enlaces más fuertes que impiden la detección de los que se rompen en los tratamientos con SDS 2% y SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (fracciones S2 y S3).

Para estudiar la naturaleza de la agregación y los cambios en esta a lo largo del tiempo de conservación consideramos necesaria una visión de conjunto de los valores obtenidos en las distintas fracciones para cada lote. Con este fin, en las figuras 4.13., 4.14., 4.15. y 4.16. se representan los resultados del estudio de extractabilidad del agregado en distintos agentes conjuntamente con las cantidades de dicho agregado obtenidas en cada lote.

La figura 4.13. muestra los cambios en el lote de músculo picado de bacalao. Inicialmente el agregado P1 detectado en la semana 22 pudo extraerse totalmente con SDS 2%, lo que parece indicar que la agregación tuvo lugar fundamentalmente por enlaces secundarios. Posteriormente se detectó un aumento en la proporción de la fracción S3, lo cual sugiere que la mayor agregación observada a lo largo del tiempo fue debida al establecimiento de enlaces S-S interproteicos. La proporción de la fracción P3, indicativa de la participación de enlaces covalentes no S-S no cambió desde la semana 36 en que fue detectada y fue similar a la observada en filetes.

En la figura 4.14. se pueden observar que en el lote de filetes de bacalao, el agregado detectado en la semana 22 tuvo naturaleza similar a la observada en el lote de músculo picado, ya que pudo extraerse totalmente con SDS 2%. A partir de la semana 36, la naturaleza de dicho agregado cambió de tal forma que se detectó la intervención de enlaces S-S y covalentes no S-S en el mismo, no observándose cambios posteriores en cuanto a la naturaleza del agregado formado.

La figura 4.15. muestra los cambios en el lote de merluza. En este lote la agregación inicial tuvo lugar con anterioridad en el tiempo, pero su naturaleza fue similar a la observada en los lotes de bacalao, pues el agregado obtenido pudo ser extraído totalmente con SDS 2%, lo cual sugiere una participación importante de las uniones secundarias. Posteriormente hubo un aumento en la proporción de las fracciones S3 y P3 que podría relacionarse con un aumento en la participación de enlaces covalentes (S-S o no S-S) en la agregación a medida que aumentó el periodo de conservación.

En el lote de bacaladilla (figura 4.16.), la cantidad de P1 formado fue similar que en merluza y también se detectó desde el principio del estudio. Este agregado inicial fue distinto del observado en los lotes anteriores, puesto que no pudo extraerse en su totalidad con SDS 2%, sino que parte del mismo se extrajo en la fracción S3 y otra parte no pudo extraerse (P3). Esta última fracción aumentó a lo largo de la conservación, lo cual podría indicar un incremento de la participación de los enlaces covalentes no S-S en el agregado. Este pudo

## EXTRACTABILIDAD MUSCULO PICADO BACALAO (B)

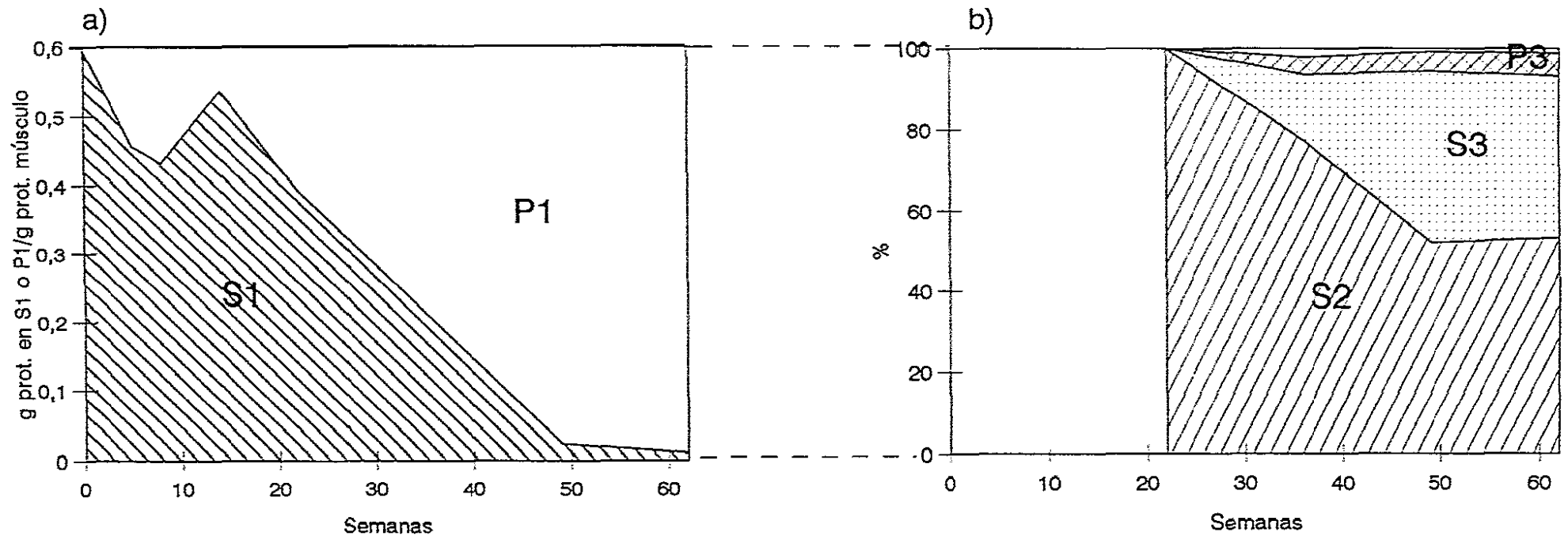


Figura 4.13.- Músculo picado de bacalao (B) conservado en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

a: Cantidad de proteína extraída y no extraída en NaCl 0,6 M (S1 y P1 respectivamente) (g proteína/g proteína de músculo)

b: Extractabilidad de P1. Porcentaje de proteína extraída en SDS 2% (S2), SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) y no extraída (P3).

## EXTRACTABILIDAD FILETES DE BACALAO (BF)

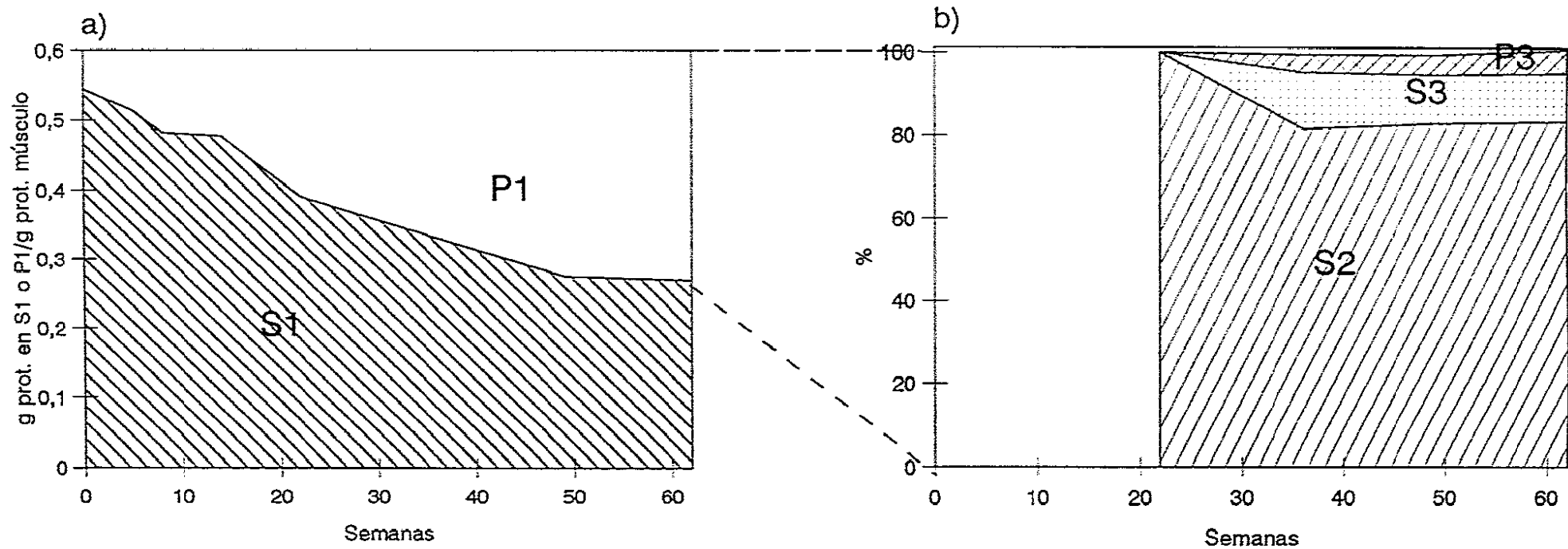


Figura 4.14.- Filetes de bacalao (BF) conservado en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$

a: Cantidad de proteína extraída y no extraída en NaCl 0,6 M (S1 y P1 respectivamente) (g proteína/g proteína de músculo)

b: Extractabilidad de P1. Porcentaje de proteína extraída en SDS 2% (S2), SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) y no extraída (P3).



## EXTRACTABILIDAD MUSCULO PICADO MERLUZA (M)

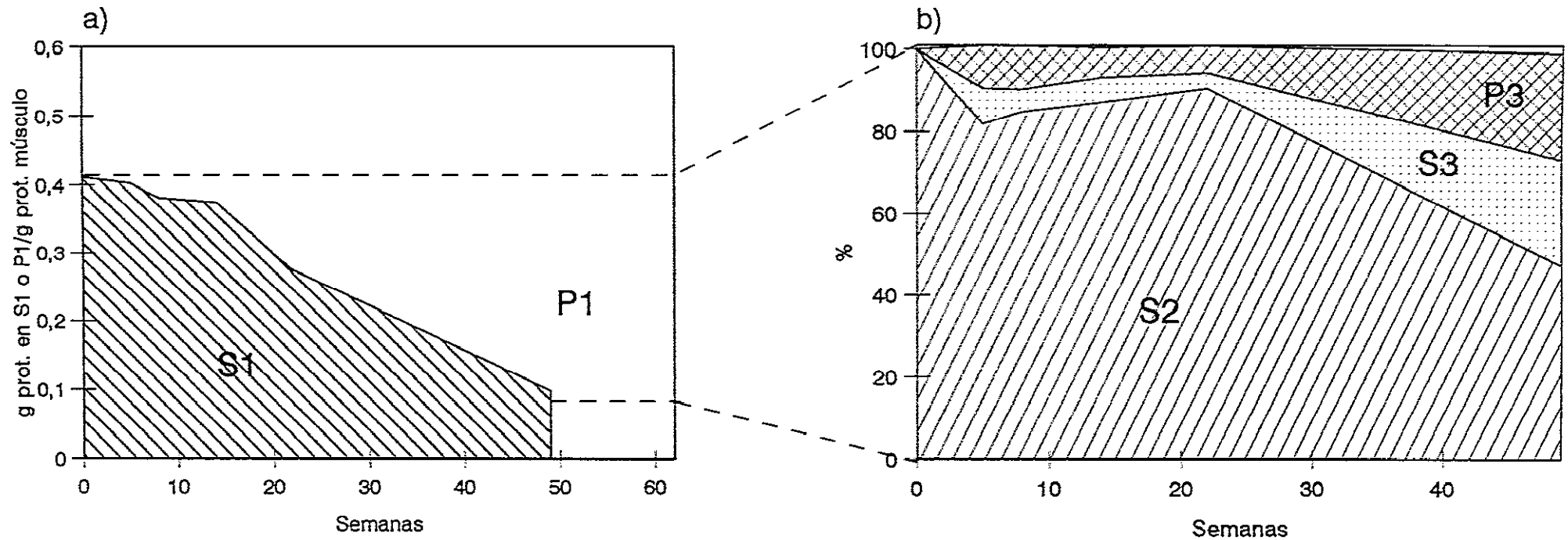


Figura 4.15.- Músculo picado de merluza (M) conservado en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$

a: Cantidad de proteína extraída y no extraída en NaCl 0,6 M (S1 y P1 respectivamente) (g proteína/g proteína músculo)

b: Extractabilidad de P1. Porcentaje de proteína extraída en SDS 2% (S2), SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) y no extraída (P3).

## EXTRACTABILIDAD MUSCULO PICADO BACALADILLA (A)

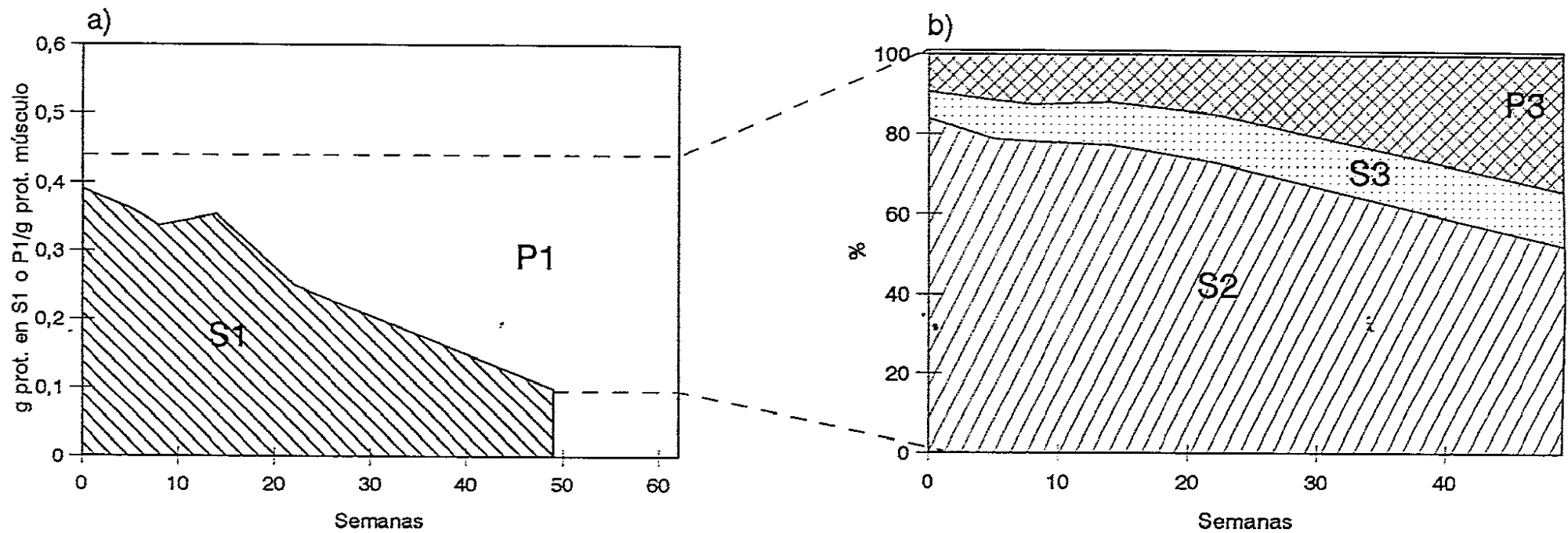


Figura 4.16.- Músculo picado de bacaladilla (A) conservado en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$   
a: Cantidad de proteína extraída y no extraída en NaCl 0,6 M (S1 y P1 respectivamente) (g proteína/g proteína músculo)  
b: Extractabilidad de P1. Porcentaje de proteína extraída en SDS 2% (S2), SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) y no extraída (P3).

enmascarar un posible cambio no detectado hacia la mayor participación enlaces S-S.

De los resultados se podría inferir que la cinética de agregación fue distinta dependiendo del grado de integridad del músculo y de la especie estudiada. En general, en la agregación hubo participación de enlaces hidrofóbicos, S-S y covalentes no S-S.

En todos los lotes hubo un descenso en la proporción de proteína de P1 extraída en SDS 2%, esto fue debido a la formación de enlaces más fuertes (S-S y covalentes). En cuanto a la participación de los enlaces S-S en la agregación, en merluza y bacaladilla no se pudo sacar conclusiones debido al aumento en la proporción de enlaces covalentes detectado que podría enmascarar su detección.

Comparando los resultados obtenidos en ambos lotes de músculo picado y filetes de bacalao (figuras 4.13. y 4.14.) se puede observar la influencia del grado de integridad del músculo. La mayor agregación observada por efecto del picado del músculo se debió fundamentalmente al aumento en la formación de enlaces S-S interproteicos, mientras que la proporción de covalentes no S-S no aumentó.

La comparación de las figuras 4.13., 4.15. y 4.16. muestra la diferente naturaleza de los agregados formados en cada especie a lo largo del tiempo de conservación. En bacalao la agregación se detectó posteriormente y fue mayor que en merluza o bacaladilla. La distinta cinética de agregación se acompañó además de una menor participación de las uniones covalentes en los agregados formados en bacalao. En bacaladilla y merluza, como ya hemos dicho, la agregación fue más temprana y aumentó más gradualmente a lo largo de la conservación. En ambas hubo mayor implicación de los enlaces covalentes en la agregación que en bacalao. Dicha implicación fue mayor en bacaladilla que en merluza y a diferencia de las otras dos especies, se observó desde el principio de la conservación.

Se sabe que el FA influye notablemente en la cantidad de agregado que se forma *in situ* durante la conservación en congelación (apartado 1.3.2.2.). En el presente estudio no se encontró una relación directa entre la cantidad de FA formado en los distintos lotes y la

cantidad de agregado formado, aunque en los lotes de músculo picado se detectó mayor formación de DMA (y por tanto de FA) y un descenso más acentuado de la solubilidad en sal.

En cuanto a la influencia del mismo en la naturaleza de esta agregación, en la literatura se encuentran resultados contradictorios. Así, músculo de bacalao bastante deteriorado por conservación en congelación pudo ser solubilizado en 1% de SDS en proporción muy alta (Connell, 1965 y 1975). Otros autores encontraron un alto porcentaje de insolubilización en merluza conservada en congelación tras el tratamiento de esta con 1% de SDS (Dingle y col., 1977). Estos explicaron la gran proporción de covalentes observada por la mayor velocidad de formación de FA en merluza. Connell (1975) por su parte demostró que si se añadía FA exógeno al músculo de bacalao en fresco se detectaba mucha mayor insolubilización en SDS.

En el presente estudio, aunque no se encontró relación entre la cantidad de FA formado en los distintos lotes y la importancia de los enlaces covalentes no S-S en la agregación, nuestros resultados sugieren la posible influencia del FA unido en la participación de dichas uniones. Así, en merluza y bacaladilla, que presentaron mayor proporción de agregado insoluble (P3) (y por tanto de enlaces covalentes no S-S), se empezó a detectar la unión de FA a proteínas más tempranamente que en bacalao (apartado 4.2.1.).

#### **4.4.- ESTUDIO ELECTROFORETICO (SDS-PAGE) DE LAS FRACCIONES EXTRAIDAS (S1, S2 y S3)**

La mayoría de los estudios realizados sobre los cambios que tienen lugar en las proteínas miofibrilares durante la conservación en congelación de músculo no tienen en cuenta la composición de los extractos proteicos en soluciones salinas, SDS y SDS +  $\beta$ -ME que se estudian en cada control a lo largo del tiempo. Las distintas proteínas que los componen tienen diferente susceptibilidad a la agregación e insolubilización. Por tanto, la proporción de las mismas en estos puede cambiar durante la conservación, con posibles implicaciones en funcionalidad y textura.

En este trabajo se pretendía poner de manifiesto los posibles cambios en composición de los extractos de proteína miofibrilar en soluciones salinas, SDS y SDS +  $\beta$ -ME, a lo largo de la conservación. En los extractos de proteicos en soluciones salinas, donde se midieron algunas propiedades funcionales de la AMN, el estudio de la composición de la misma por electroforesis nos permitió interpretar mejor algunos de los resultados obtenidos. Otro objetivo fue estudiar la implicación de las proteínas mayoritarias (CPM y Ac) en los agregados formados por enlaces covalentes.

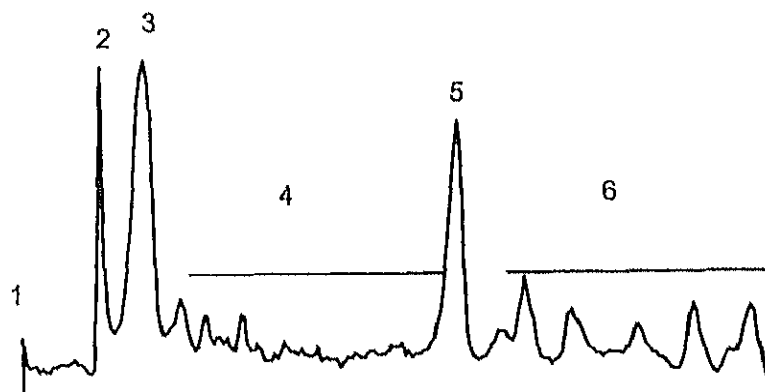
Para ello, en cada una de las fracciones se midieron los cambios en proporción de las proteínas mayoritarias (CPM y Ac) por medio de la medida de la DOI/g prot. de las bandas correspondientes a estas proteínas. Los cambios en la proporción de las otras proteínas minoritarias no se cuantificaron, aunque estos se estudiaron de forma no cuantitativa observando los perfiles electroforéticos.

Para interpretar los cambios observados en la proporción de CPM y Ac (medidos a través de los cambios en DOI/g prot) de manera paralela a los cambios de extractabilidad se realizó una comparación entre los valores obtenidos en los distintos lotes en cada fracción. También se compararon los valores obtenidos en las distintas fracciones en cada lote, para poder estudiar las relaciones entre los cambios observados en las distintas fracciones. De esta manera se puede obtener información acerca de la naturaleza de la proteína del agregado que no se pudo extraer por el tratamiento aplicado (P3).

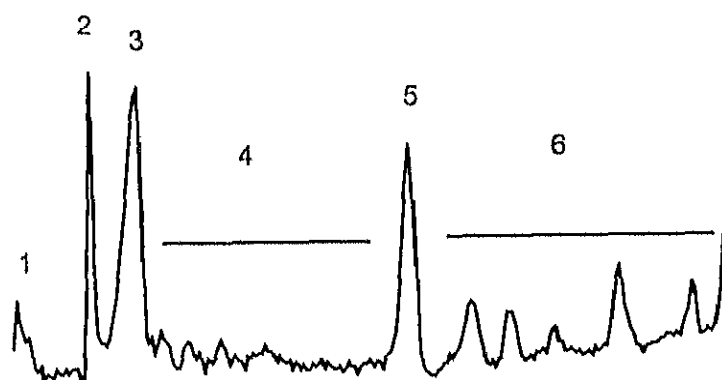
#### 4.4.1.- PATRON ELECTROFORETICO DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

La caracterización de la AMN de las tres especies estudiadas por electroforesis se llevó a cabo inmediatamente después de su extracción utilizando geles de acrilamida al 12,5%.

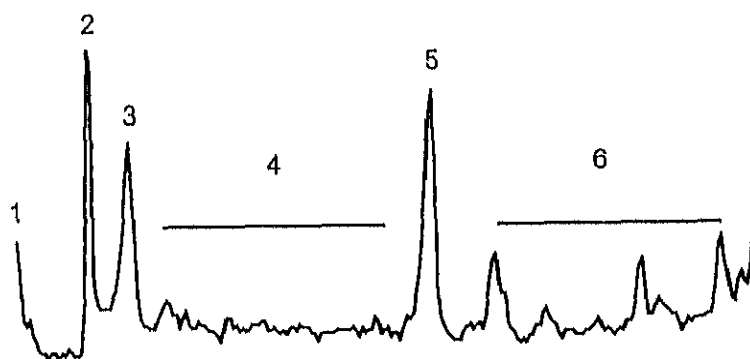
En general en el perfil electroforético de las actomiosinas procedentes de las tres especies estudiadas (figura 4.17.) se pudo observar la presencia de distintas bandas correspondientes a determinadas proteínas miofibrilares:



Bacalao



Merluza



Bacaladilla

Figura 4.17.- Perfil electroforético (SDS-PAGE) de la actomiosina natural (AMN) aislada de músculo fresco de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A). Identificación de picos y zonas en apartado 4.4.1.

**pico 3** – Cadena pesada de miosina (CPM): PM~195 kDa (Stefansson y Hultin, 1994)

La intensidad del pico de CPM en bacaladilla fresca fue menor que en las otras especies.

**zona 4** – Grupo de proteínas de difícil identificación entre las que se encuentran la C-proteína: PM~140 kDa y  $\alpha$ -actinina: PM~103 kDa (Seki, 1977, Stefansson y Hultin, 1994).

**pico 5** – Actina (Ac): PM~45 kDa (Stefansson y Hultin, 1994)

**zona 6** – Las bandas que aparecen a pesos moleculares inferiores a 45.000 dalton corresponden a tropomiosina (PM~35.5 kDa, Stefansson y Hultin, 1994), troponinas y cadenas ligeras de la miosina. En cuanto a las troponinas, resulta difícil localizar correctamente, y por tanto identificar cada una de estas proteínas porque sus pesos moleculares están muy próximos. Además, hay una gran variabilidad en cuanto al peso molecular de las mismas dependiendo del músculo y de la especie (Skaara y Regenstein, 1990). La troponina T tiene un peso molecular aproximado de 37 kDa, la troponina C, entre 17 y 19 kDa y la troponina I de 20 kDa (Seki, 1977). Tampoco pudieron identificarse con claridad las cadenas ligeras de miosina (CLMs), las cuales tienen un peso molecular que, dentro del rango comprendido entre 18 y 25 kDa, depende de la especie de pescado (Skaara y Regenstein, 1990).

En los perfiles se observaron también otros picos cuyos cambios en las muestras extraídas a lo largo de la conservación fueron objeto de estudio en el presente trabajo. El pico 1 corresponde al punto de aplicación de la muestra. El pico 2 corresponde a la línea de separación entre las zonas de concentración y separación del gel. Se comprobó que estos picos presentaban una intensidad mínima cuando la proteína analizada era fresca. Por tanto, un aumento de la intensidad de estos picos pondría de manifiesto la presencia agregados proteicos de peso molecular superior a 220 kDa (máximo peso molecular de las proteínas que pueden entrar al gel).

#### 4.4.2.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS DISTINTOS LOTES (B, BF, M, A) EN CADA FRACCION EXTRAIDA (S1, S2 y S3)

En cada una de las fracciones solubles obtenidas del estudio de solubilidad (S1, S2 y S3) se estudiaron los cambios en la proporción de las proteínas mayoritarias (miosina y actina) por medio de la medida de la intensidad relativa (DOI/g prot.) de las bandas correspondientes a la CPM y la Ac y los cambios no cuantitativos en las otras proteínas por medio de la observación de los perfiles electroforéticos.

##### 4.4.2.1.- Cambios electroforéticos en fracción S1 (NaCl 0,6 M)

##### Cambios en la banda de cadena pesada de miosina (CPM)

Los cambios observados en la proporción de CPM extraída en NaCl 0,6M (S1), medida por medio de la DOI/g prot. de la banda correspondiente, están representados en la figura 4.18. El análisis estadístico se muestra en las tabla 4.11 a y b. En la figura 4.18. se puede observar como no hubo diferencias significativas entre filetes y músculo picado de bacalao. Lo más destacado de los cambios observados en ambos lotes de bacalao a lo largo del tiempo fue el descenso detectado a partir de la semana 22 de conservación.

Se detectaron diferencias significativas entre lotes de músculo picado (tabla 4.11. b). En bacaladilla se observó una proporción de CPM inferior a la detectada en bacalao hasta la semana 22 e inferior a la de merluza durante toda la conservación. Como ya se ha indicado en la descripción del patrón electroforético de las tres especies, la proporción de CPM en bacaladilla fresca fue menor que en las otras especies, lo cual sugiere una mayor labilidad de la CPM en esta especie.

En los lotes de músculo picado de merluza y bacaladilla se observó un descenso en las primeras semanas de conservación. En ambos lotes el descenso fue menos importante que el



SDS-PAGE, CADENA PESADA DE MIOSINA (CPM)  
S1 (0.6M NaCl)

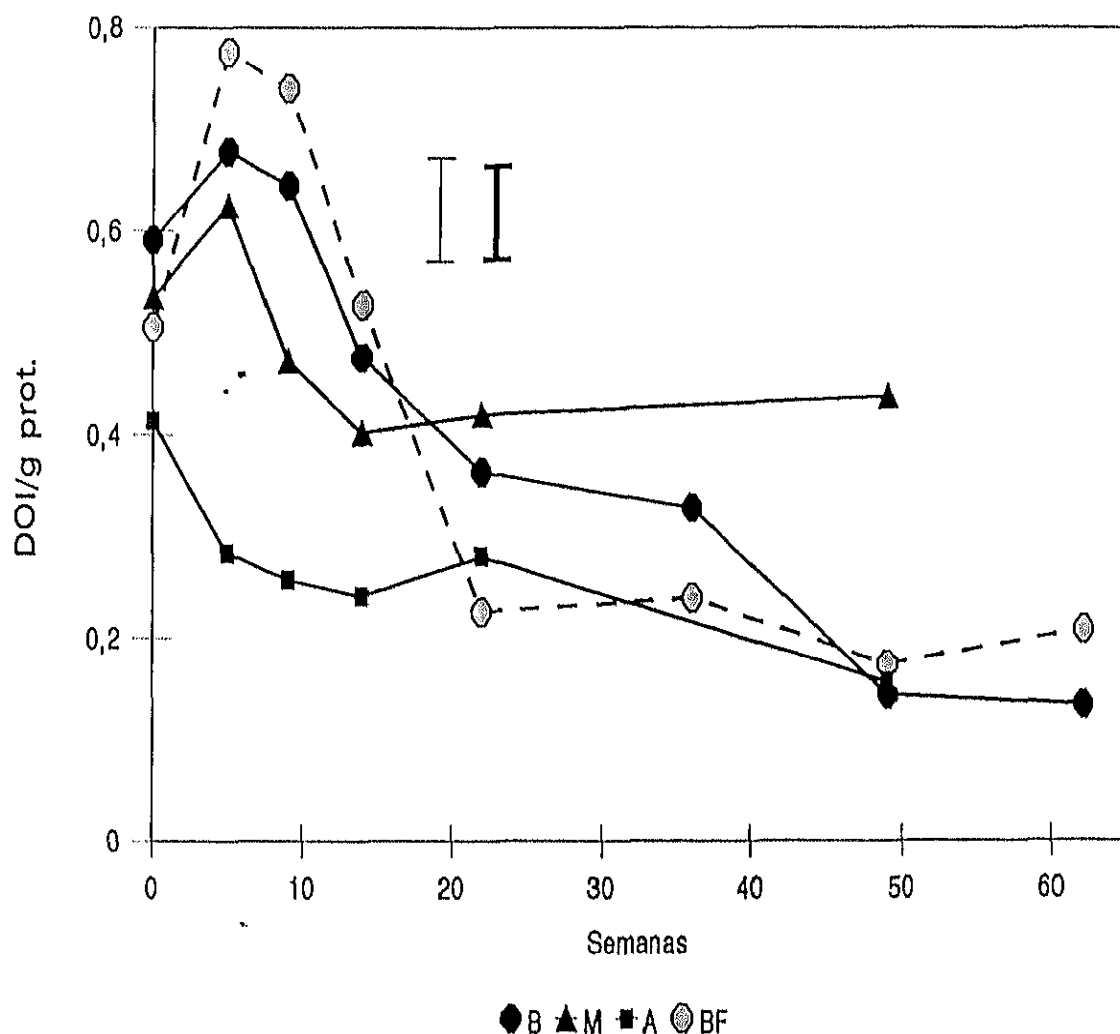


Figura 4.18.- Evolución de la densidad óptica integrada (DOI) de la banda de la cadena pesada de miosina (CPM) (DOI/g prot.) de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1). Filetes de bacalao (BF) y músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) conservados en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso corresponde al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

observado en los lotes de bacalao. Este se detectó en merluza en las primeras 14 semanas y en bacaladilla en las 5 primeras semanas de conservación. En ambos lotes no hubo cambios significativos posteriores. Esto contrasta con lo observado en músculo picado de bacalao, donde, como ya se ha indicado, el descenso observado continuó a lo largo de la conservación hasta alcanzar valores similares a los de bacaladilla en el último control.

El descenso en la proporción de CPM observado en todos los lotes coincide con los resultados obtenidos por diversos autores en distintas especies de gádidos durante la conservación en congelación (Dingle y Hines, 1975; Matthews y col., 1980; Laird y Mackie, 1981; Lim y Haard, 1984; Owusu-Ansah y Hultin, 1986; LeBlanc y LeBlanc, 1989; Ragnarsson y Regenstein, 1989; Huidobro y Tejada, 1995).

Los cambios en proporción de miosina en la AMN extraída en solución salina a lo largo de la conservación fueron distintos en cada especie y no dependieron del grado de integridad. Tampoco dependieron de la cinética de agregación, ya que esta fue similar en merluza y bacaladilla, encontrándose en bacaladilla menor proporción inicial de miosina y mayores cambios en esta a lo largo de la conservación. Estos cambios en proporción de CPM en los extractos de AMN observados a lo largo de la conservación podrían influir sobre las distintas determinaciones que se llevaron a cabo en estos.

Si tenemos en cuenta los valores de extractabilidad en NaCl 0,6M (figuras 4.13. a 4.16.), la cantidad total de CPM extraída descendió en todos los lotes. Este descenso fue superior en músculo picado de bacalao que en las otras especies. En este lote se observó una cantidad final de miosina inferior a las otras especies aun cuando se partió de una cantidad superior. Los menores cambios en cantidad de miosina extraída en NaCl 0,6 M se observaron en merluza. En bacaladilla se observó la menor cantidad inicial de miosina aislada en S1. Por otro lado, el picado del músculo provocó un mayor descenso en la cantidad total de CPM en dicha fracción a lo largo de la conservación.

### Cambios en la banda de actina (Ac)

Los cambios observados en la proporción de Ac extraída en NaCl 0,6M (S1), medida por medio de la DOI/g prot. de la banda correspondiente, están representados en la figura 4.19. En bacalao hubo diferencias significativas entre los lotes filetes y músculo picado a partir de la semana 36 de conservación (tabla 4.12. a), presentando los filetes valores superiores. En ninguno de los dos lotes de bacalao se observó una tendencia sostenida durante el almacenamiento.

Las diferencias entre los tres lotes de músculo picado fueron significativas (tabla 4.12. b), presentando la merluza los valores más elevados. En dicho lote hubo un ligero descenso a lo largo de la conservación mientras que en bacaladilla no se observaron diferencias significativas con el tiempo.

Dados los valores de proporción de Ac en los extractos en solución salina, la cantidad total de Ac extraída en la fracción S1 descendió en todos los lotes, ya que en estos se observó un descenso de la cantidad de proteína extraída a lo largo de la conservación (figura 4.6.). Sin embargo, este descenso fue menos evidente que el observado en cantidad total de miosina, ya que la proporción de esta proteína en los extractos salinos disminuyó de manera mucho más importante. La mayor estabilidad de la Ac frente a la miosina durante la conservación en congelación ha sido indicada por otros autores (Connell, 1960 a y b; Kim y col, 1984; Owusu-Ansah y Hultin, 1986; LeBlanc y LeBlanc, 1989).

Considerando los cambios observados en extractabilidad de AMN (figuras 4.6.) y en proporción de CPM y Ac en los extractos (figuras 4.18. y 4.19.), se podría inferir que existen diferencias en cuanto al mecanismo de agregación entre las tres especies. En bacalao y bacaladilla parece que la miosina está más implicada en la agregación que en merluza ya que, a valores similares de extractabilidad, observados en las etapas finales de la conservación, esta especie presentó mayor proporción de CPM en los extractos, lo cual implica menor proporción de la misma en el agregado.

SDS-PAGE, ACTINA (Ac)  
S1 (0.6M NaCl)

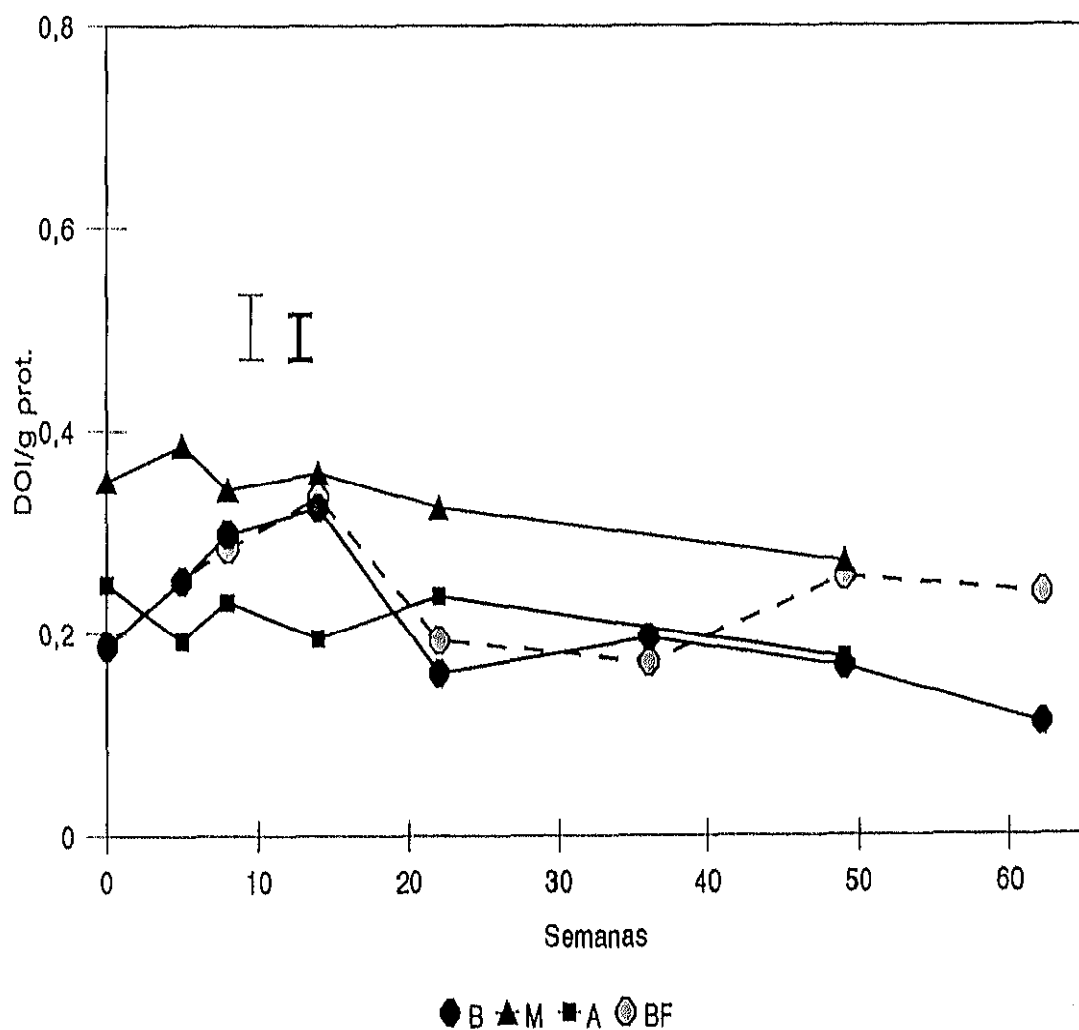


Figura 4.19.- Evolución de la densidad óptica integrada (DOI) de la banda de la actina (Ac) (DOI/g prot.) de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1). Filetes de bacalao (BF) y músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) conservados en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso corresponde al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
Ac	***	**	**

Tabla 4.12. a - Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot de la banda de actina (Ac) obtenida de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado ."

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
Ac	***	***	***

Tabla 4.12. b - Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la DOI/g prot. de la banda de actina (Ac) obtenida de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y de la especie.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

### Perfiles electroforéticos

En las figuras 4.20. y 4.21. se pueden observar los cambios en los perfiles electroforéticos de la proteína extraída en las fracciones S1 por efecto de la conservación en congelación en los distintos lotes. En músculo picado de bacalao (figura 4.20., B), además de lo descrito en las bandas de CPM y Ac, se observó un claro aumento de la proporción de las bandas en la zona 6 (TM y TNs), en la semana 62. Este aumento ha sido descrito por Laird y Mackie (1981) en músculo picado de bacalao a  $-15^{\circ}\text{C}$  durante 18 meses y por LeBlanc y LeBlanc (1989) en filetes de bacalao conservado a varias temperaturas y se explica por la disminución en la proporción de CPM en relación a la disminución de la proporción de las otras. Sin embargo, en el lote de filetes de bacalao (figura 4.20., BF) no se observaron cambios en dichas bandas. Esto es debido probablemente a que la proporción de Ac fue superior en filetes que en músculo picado al final de la conservación (figura 4.19.). Esta mayor proporción de Ac podría contrarrestar el descenso en CPM.

En ambos lotes de bacalao, la intensidad del pico 1 observada al principio de la conservación indica la presencia de agregados formados por enlaces covalentes no S-S en los extractos salinos. Esta intensidad disminuye al final de la conservación. La causa de esta disminución está probablemente en que los agregados formados en las etapas finales de la conservación son demasiado grandes para ser extraídos en la fracción S1.

En merluza (figura 4.21., M) se observó un ligero incremento en la proporción de las proteínas de peso molecular inferior al de la Ac (TM y TNs). El pico 1 presentó una alta intensidad, poniendo de manifiesto la presencia de una gran proporción de agregados formados por enlaces covalentes no S-S extraídos en S1 desde el principio de la conservación en este lote.

En bacaladilla (figura 4.21., A) se observó que el descenso ya indicado en la proporción de CPM (pico 3) fue acompañado de un incremento en la banda correspondiente a la tropomiosina (zona 6, pico a). En la zona de aplicación de la muestra se detectó la presencia de agregados (pico 1), cuya proporción disminuyó al final de la conservación,

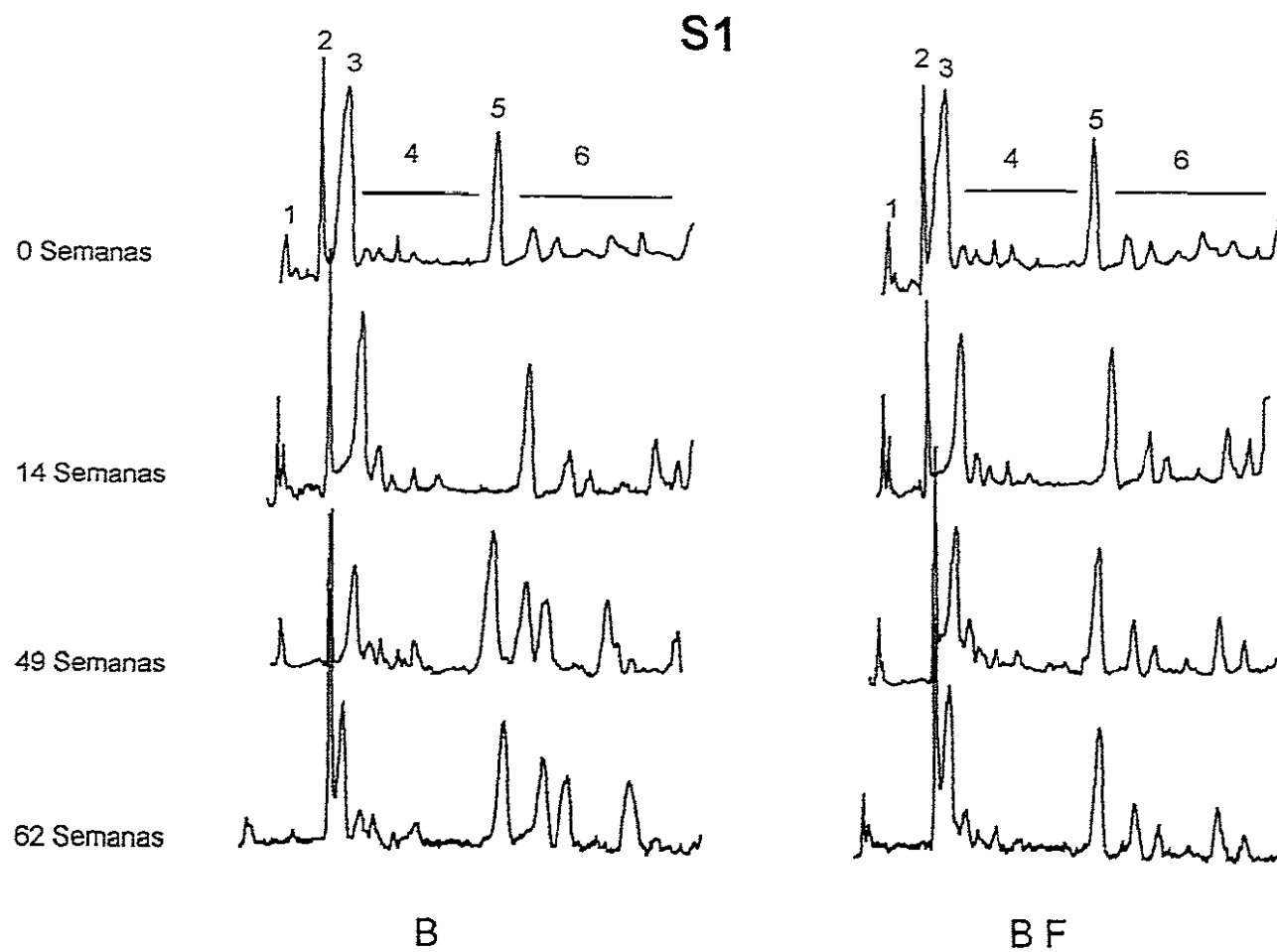


Figura 4.20.- Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de la actomiosina natural (AMN) extraída en S1 (NaCl 0,6 M) de músculo en las semanas 0, 14, 49 y 62 de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . BF, B: lotes de filetes y músculo picado de bacalao respectivamente. Identificación de picos y zonas en el apartado 4.1.1.

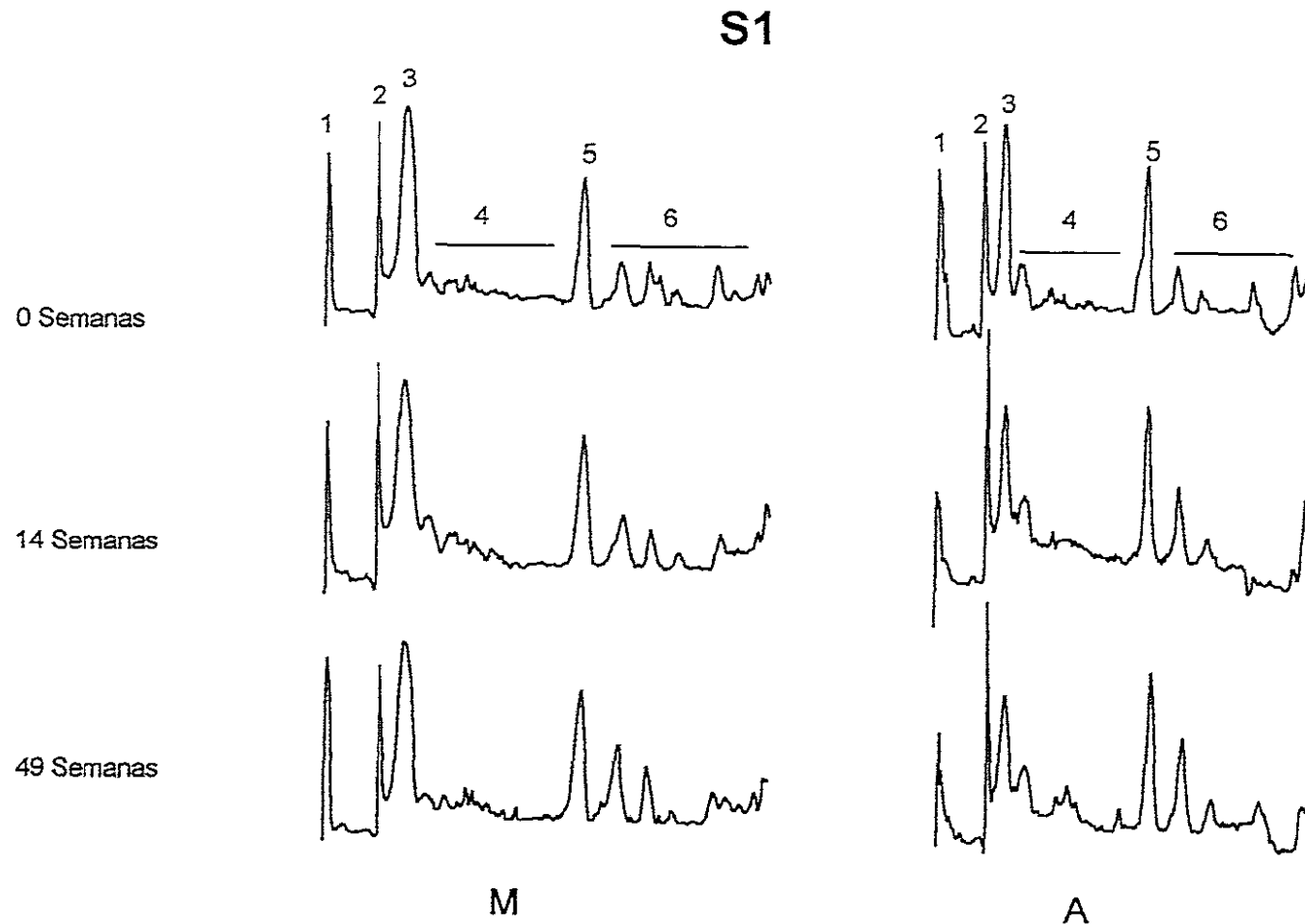


Figura 4.21.— Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de la actomiosina natural (AMN) extraída en S1 (NaCl 0,6 M) de músculo en las semanas 0, 14 y 49 de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . M y A: lotes de músculo picado de merluza y bacaladilla respectivamente. Identificación de picos y zonas en el apartado 4.1.1.



probablemente debido a un aumento en el peso molecular de los mismos a lo largo del tiempo de conservación, como se observó en bacalao (figura 4.20.).

Al igual que lo observado en el presente estudio, muchos autores han detectado la aparición de agregados en los extractos de AMN en soluciones salinas por efecto de la conservación en congelación en diversas especies de gadiformes (Ragnarsson y Regenstein, 1989). Otros autores han encontrado además una disminución de la proporción de CPM paralela a la formación de agregados (Matthews y col., 1979; Owusu-Ansah y Hultin, 1986). Esto indica que parte de la proteína agregada por enlaces covalentes se extrae en S1.

En general, el estudio de los perfiles electroforéticos de la fracción S1 indica que la TM presentó gran estabilidad a la conservación en congelación respecto a las otras proteínas. Esto coincide con lo observado por otros autores (Laird y Mackie, 1981; LeBlanc y LeBlanc, 1989).

#### 4.4.2.2.- Cambios electroforéticos en fracción S2 (SDS 2%)

##### Cambios en la banda de cadena pesada de miosina (CPM)

Los cambios observados en la proporción de CPM extraída en SDS 2% (S2), medida por medio de la DOI/g prot. de la banda correspondiente, están representados en la figura 4.22. Los resultados del estudio estadístico están recogidos en la tablas 4.13. a y b No se detectaron diferencias significativas entre los lotes de músculo picado y filetes de bacalao (tabla 4.13. a). No se observó una tendencia determinada en ninguno de los dos lotes a lo largo del tiempo.

La proporción de CPM extraída con SDS 2% presentó valores muy superiores en merluza que en bacaladilla. Aunque no se pudo realizar comparación estadística entre los tres lotes de músculo picado, ya que en bacalao se detectó S2 en etapas más avanzadas de la

...  
**SDS-PAGE, CADENA PESADA DE MIOSINA (CPM)**  
**S2 (SDS 2%)**

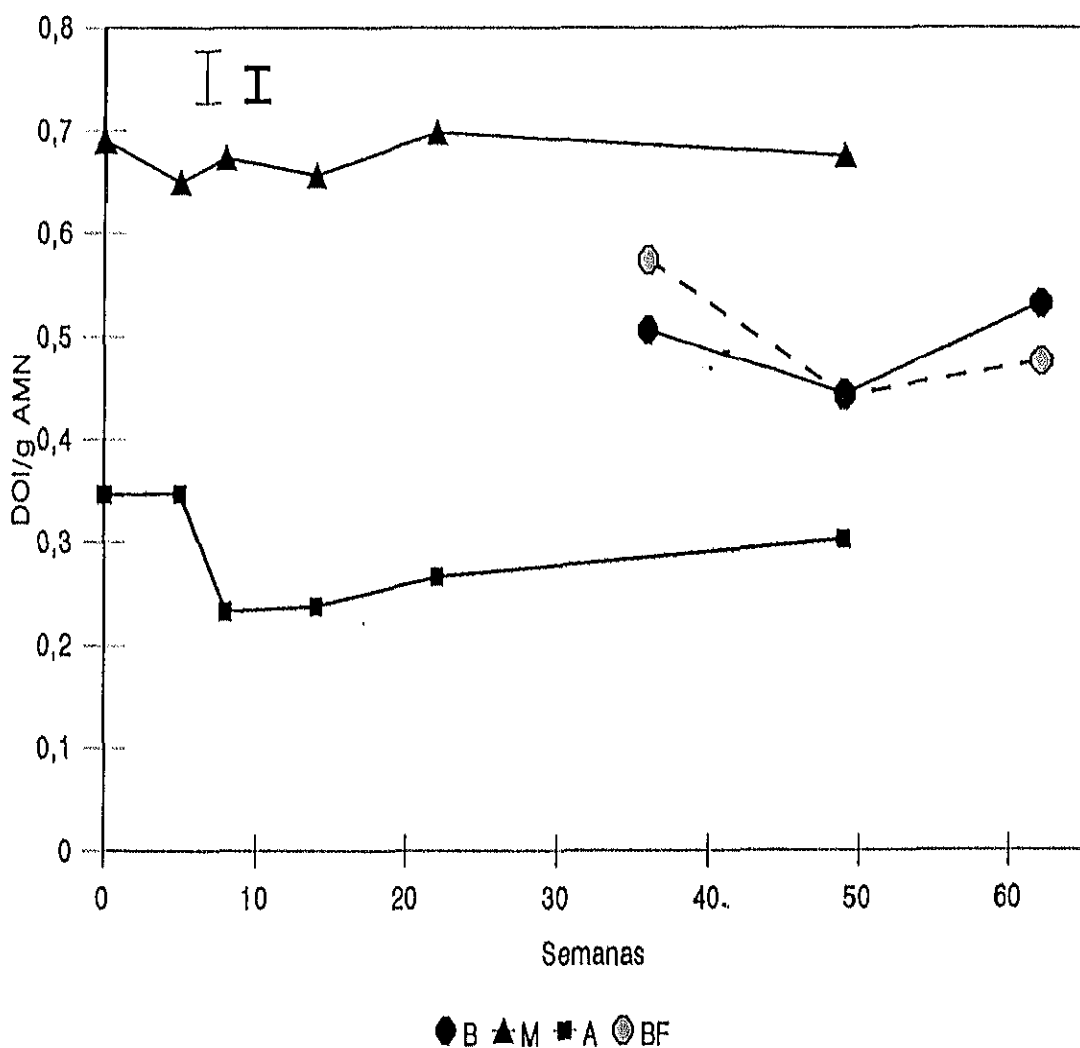


Figura 4.22.- Evolución de la densidad óptica integrada (DOI) de la banda de la cadena pesada de miosina (CPM) (DOI/g prot.) de la proteína extraída en SDS 2% (S2). Filetes de bacalao (BF) y músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) conservados en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso corresponde al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
CPM	***	-	*

Tabla 4.13. a – Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot. de la banda de la cadena pesada de la miosina (CPM) obtenida de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en SDS 2% (S2) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
CPM	***	***	***

Tabla 4.13. b – Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot. de la banda de la cadena pesada de la miosina (CPM) obtenida de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en SDS 2% (S2) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y de la especie.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

conservación, en esta especie se observaron valores intermedios a los observados en merluza y bacaladilla. En merluza no se observaron cambios significativos a lo largo del tiempo. En bacaladilla hubo un descenso significativo en la semana 8, permaneciendo constante a continuación.

#### Cambios en la banda de actina (Ac)

Los cambios observados en la proporción de Ac extraída en SDS 2% (S2), medida por medio de la DOI/g prot. de la banda correspondiente, están representados en la figura 4.23. Los resultados del estudio estadístico están recogidos en las tablas 4.14. a y b. No se observaron diferencias significativas entre músculo picado y filetes de bacalao (tabla 4.14. a). El efecto del tiempo fue poco significativo en filetes, detectándose un aumento en el límite de significatividad en la semana 49. En músculo picado no hubo cambios significativos a lo largo del tiempo. Aunque no se realizó comparación estadística (por no detectarse S2 en bacalao hasta la semana 36), los valores de bacalao fueron similares a los de bacaladilla. En estas dos especies la proporción de Ac fue significativamente superior (tabla 4.14. b) a la observada en merluza. Esto es lógico, ya que la proporción de miosina en estas fue menor. En merluza no hubo cambios significativos a lo largo del tiempo y en bacaladilla se observó un descenso en la semana 8 de conservación.

Si se tienen en cuenta que la proporción de la fracción S2 respecto al agregado P1 baja en todos los lotes a lo largo de la conservación (figuras 4.13. a 4.16.), los resultados del presente estudio electroforético indican que las cantidades de CPM y Ac extraídas de 100g de P1, sobre todo la de CPM, disminuyeron en todos los lotes a lo largo de la conservación. Por tanto se podría inferir que a medida que aumenta el tiempo de conservación aumenta la proporción de MHC y Ac que se agrega formando enlaces covalentes. Esto es especialmente notable en bacaladilla, donde además de observarse una disminución importante del porcentaje de proteína extraída en SDS 2% (figura 4.13.), se detectó un descenso de la proporción de CPM y Ac en dicha fracción (figuras 4.22. y 4.23.).

SDS-PAGE, ACTINA (Ac)  
S2 (SDS 2%)

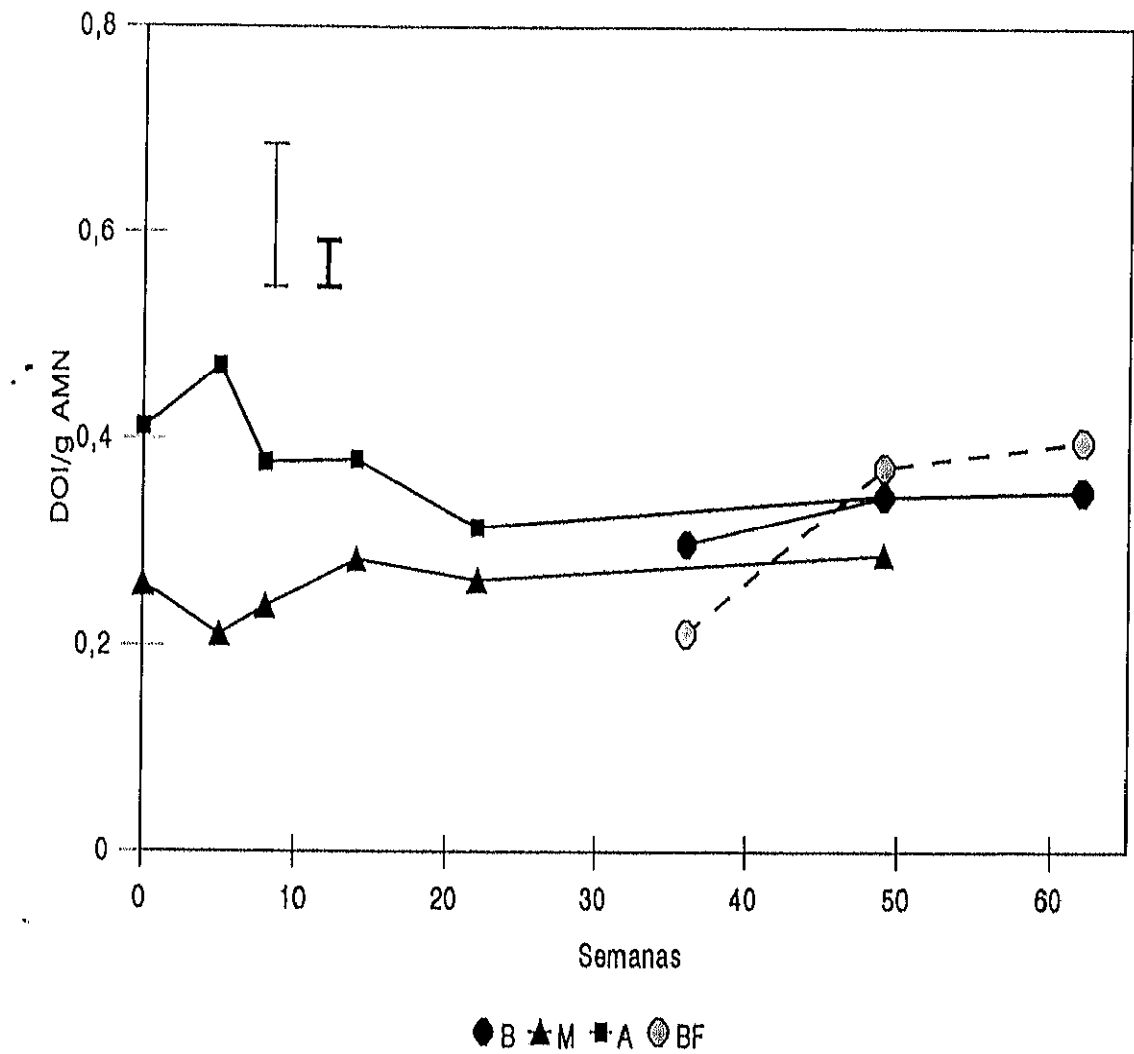


Figura 4.23.- Evolución de la densidad óptica integrada (DOI) de la banda de la actina (Ac) (DOI/g prot.) de la proteína extraída en SDS 2% (S2). Filetes de bacalao (BF) y músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) conservados en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso corresponde al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
Ac	*	-	-

Tabla 4.14. a – Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot. de la banda de actina (Ac) obtenida de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en SDS 2% (S2) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
Ac	*	***	***

Tabla 4.14. b – Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot. de la banda de actina (Ac) obtenida de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en SDS 2% (S2) de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y de la especie.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

S2

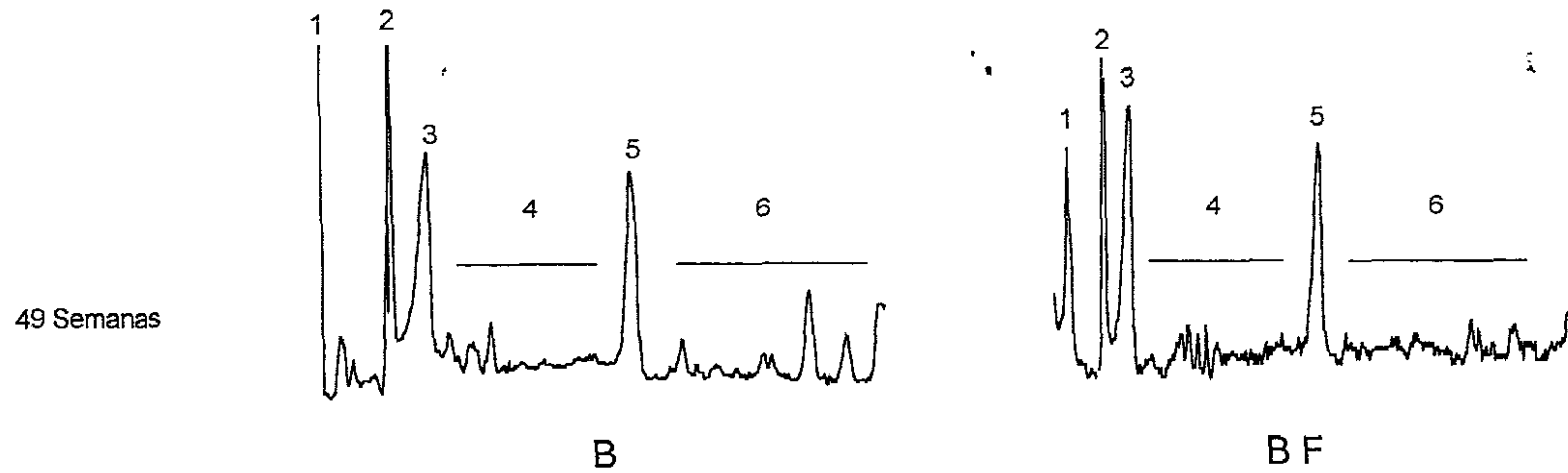


Figura 4.24.- Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de la proteína extraída en SDS 2% (S2) en la semana 49 de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . BF, B: lotes de filetes y músculo picado de bacalao respectivamente. Identificación de picos y zonas en el apartado 4.1.1.

**S2**

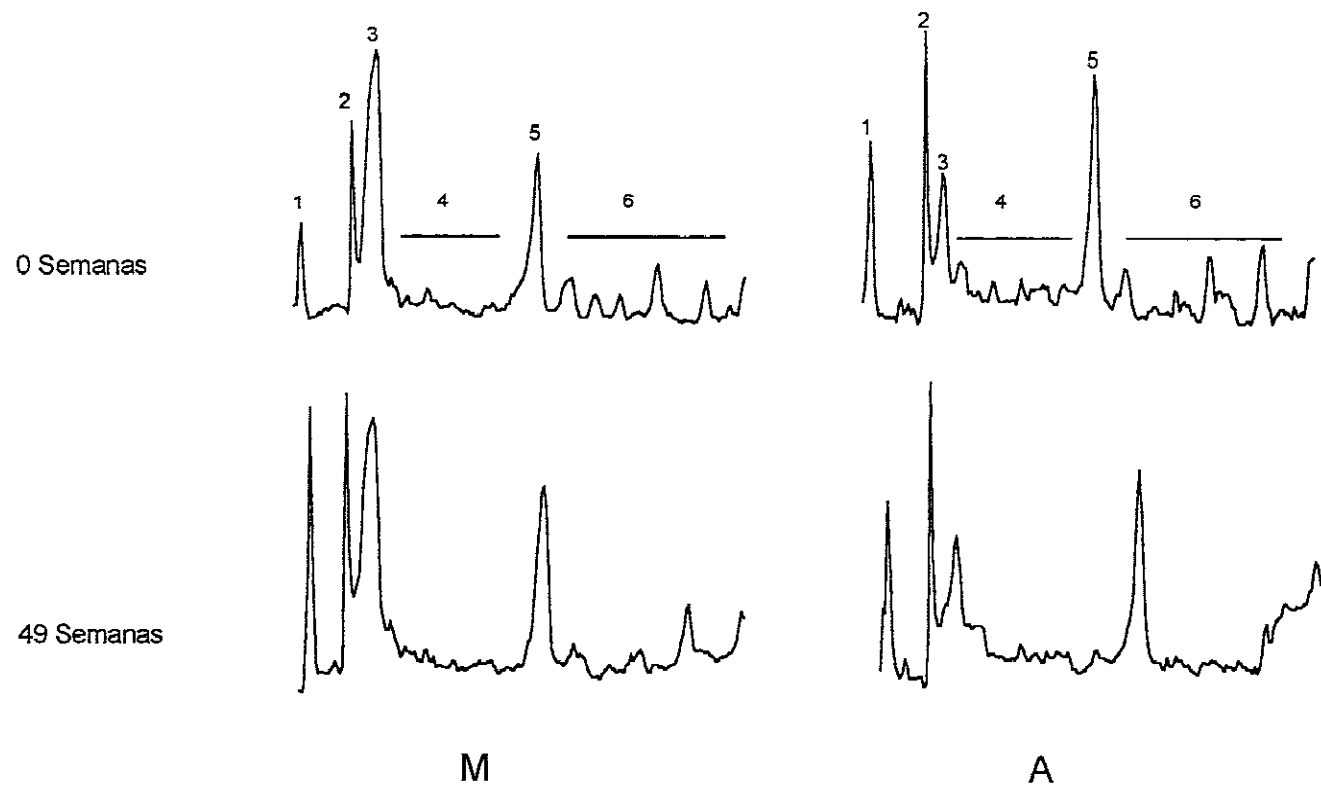


Figura 4.25.- Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de la proteína extraída en 2% SDS (S2) en las semanas 0 y 49 de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . M y A: lotes de músculo picado de merluza y bacaladilla respectivamente. Identificación de picos y zonas en el apartado 4.1.1.



### Perfiles electroforéticos

En la figura 4.24. se pueden observar los perfiles electroforéticos correspondientes a la fracción S2 obtenida en semana 49 de conservación en los lotes de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente). Los perfiles observados en los demás controles en estos lotes fueron similares. En la figura 4.25. se muestran los perfiles electroforéticos de la proteína extraída en la fracción S2 en los lotes de merluza (M) y bacaladilla (A) a las 0 y 49 semanas de conservación en congelación

Como ya se ha indicado, no se observaron cambios en bacalao a lo largo del tiempo. En bacaladilla no se observaron cambios importantes a lo largo del tiempo. En merluza se observó un aumento en la intensidad del pico 1 a las 49 semanas de conservación, lo cual indica la presencia de agregados formados por enlaces covalentes no S-S.

En todos los lotes se detectó la presencia de agregados que no entraron en el gel (pico 1). Los enlaces interproteicos que dieron lugar a la formación de estos agregados proteicos serían presumiblemente covalentes no S-S. Esto coincide con lo observado por Lim y Haard (1984), quienes detectaron una banda de PM elevado en las electroforesis de los sobrenedantes obtenidos al tratar con 4% SDS el agregado insoluble en soluciones salinas formado durante la conservación a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante 4 meses de músculo picado de cglefino. Dichos autores atribuyeron esta banda a la presencia de agregados covalentes en la fracción soluble en SDS. También Matthews y col. (1979) observaron la aparición de esta banda en la fracción obtenida al extraer con 4% SDS músculo picado de bacalao conservado a  $-7^{\circ}\text{C}$  durante 85 días.

#### **4.4.2.3.- Cambios electroforéticos en la fracción S3 (SDS 2% + $\beta$ -ME 5%)**

##### Cambios en la banda de cadena pesada de miosina (CPM)

En la figura 4.26. se pueden observar los cambios en la proporción de CPM extraída

SDS-PAGE, CADENA PESADA DE MIOSINA (CPM)  
S3 (SDS 2% + ME 5%)

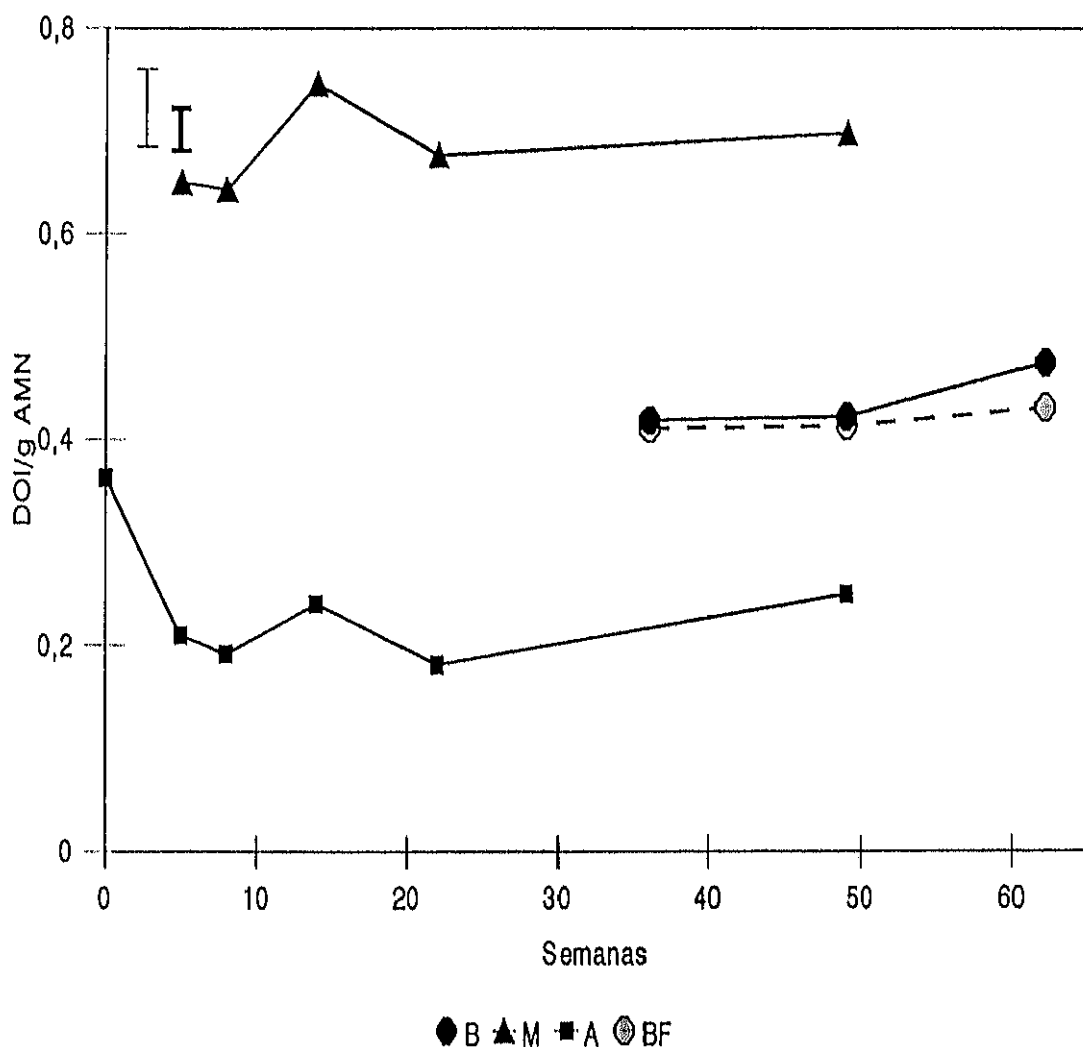


Figura 4.26.- Evolución de la densidad óptica integrada (DOI) de la banda de la cadena pesada de miosina (CPM) (DOI/g prot.) de la proteína extraída en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3). Filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) conservados en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso corresponde al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
CPM	*	-	-

Tabla 4.15. a – Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot. de la banda de la cadena pesada de la miosina (CPM) obtenida de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
CPM	***	***	***

Tabla 4.15. b – Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot. de la banda de la cadena pesada de la miosina (CPM) obtenida de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y de la especie.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

en la fracción S3, medidos a través del valor de DOI/g prot. Los resultados del análisis estadístico correspondiente se pueden observar en las tablas 4.15. a y b. En los lotes de filetes y músculo picado de bacalao no hubo cambios significativos a lo largo del tiempo. No se encontraron diferencias significativas entre ambos lotes de esta especie (figura 4.26. y tabla 4.15. b).

El lote de músculo picado de merluza presentó valores muy superiores al de bacaladilla. En dicho lote, aunque a lo largo del tiempo se detectaron cambios significativos (tabla 4.15. b), estos oscilaron siempre dentro de un rango concreto sin que se observara una tendencia definida. Sin embargo, en bacaladilla hubo un claro descenso durante las primeras cinco semanas de conservación.

Teniendo en cuenta el porcentaje respecto a P1 (agregado no extraído en NaCl 0,6 M) de proteína extraída en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (fracción S3, figuras 4.13. a 4.16.), los resultados indican que los cambios en cantidad de CPM extraída de 100g de P1 en la fracción S3 a lo largo del tiempo de conservación dependieron de la especie estudiada. En músculo picado de bacalao y merluza se observó un aumento que sugiere una aumento de la participación de la CPM en la formación de enlaces S-S. En bacaladilla se detectó un descenso, aunque no se puede inferir nada acerca de cambios en la participación de la CPM en enlaces S-S, ya que el incremento en la formación de enlaces covalentes no S-S observado pudo haber enmascarar estos cambios (figura 4.16.). En filetes de bacalao no hubo cambios a lo largo de la conservación en cuanto a participación de la CPM en enlaces S-S.

#### Cambios en la banda de actina (Ac)

Los cambios en proporción de la Ac extraída en la fracción S3, medidos a través del valor de DOI/g prot. se muestran en la figura 4.27. Los resultados del análisis estadístico correspondiente se recogen en las tablas 4.16. a y b. No se encontraron diferencias entre lotes de músculo picado y filetes de bacalao (tabla 4.16. a). En filetes no se observaron cambios a lo largo del tiempo mientras que en músculo picado hubo un ligero aumento en el control

SDS-PAGE, ACTINA (Ac)  
S3 (SDS 2% + ME 5%)

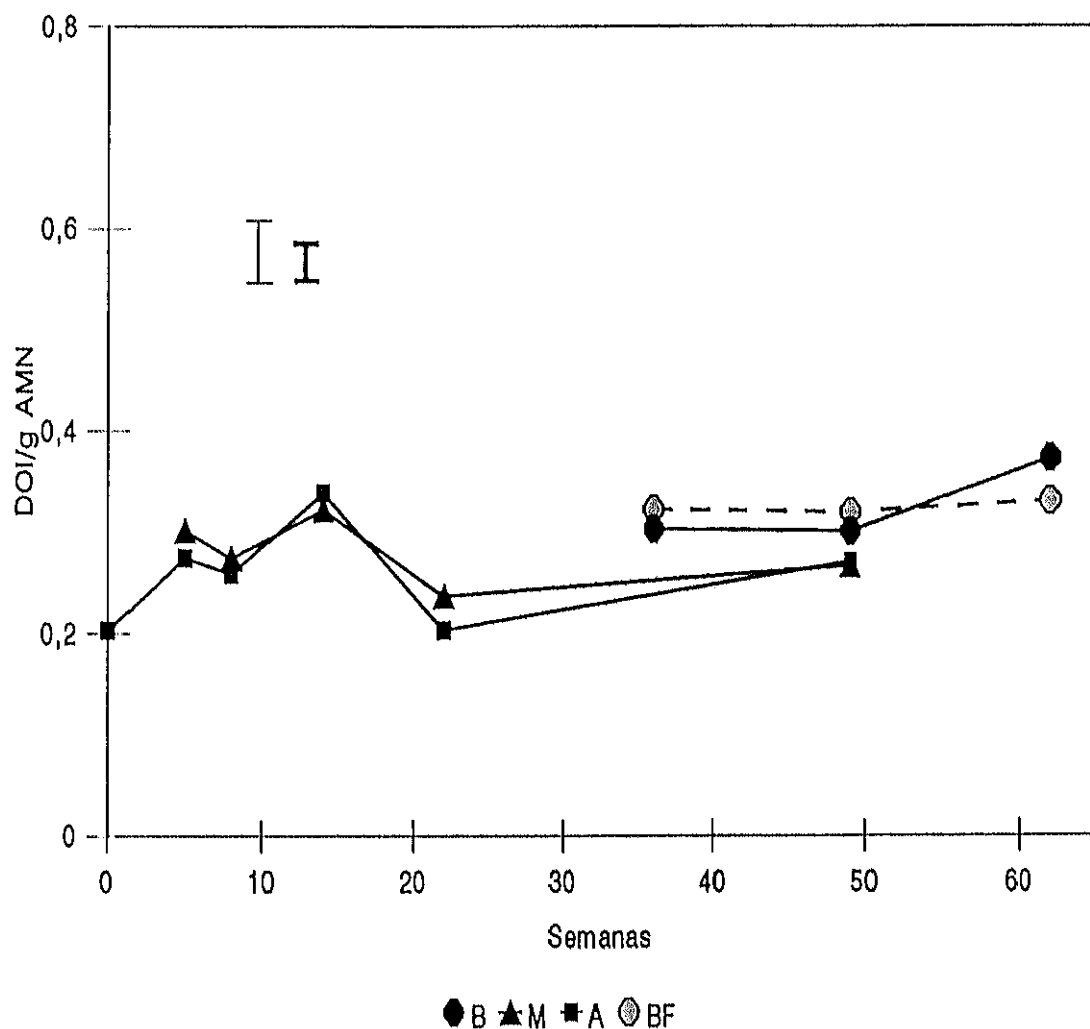


Figura 4.27.— Evolución de la densidad óptica integrada (DOI) de la banda de la actina (Ac) (DOI/g prot.) de la proteína extraída en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3). Filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) conservados en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
Ac	***	**	**

Tabla 4.16. a – Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot. de la banda de actina (Ac) obtenida de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
Ac	***	***	***

Tabla 4.16. b – Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot. de la banda de actina (Ac) obtenida de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y de la especie.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

final.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a proporción de Ac en la fracción S3 entre los lotes de músculo picado de merluza y bacaladilla (tabla 4.16. b). En ninguno de los dos lotes se observó una tendencia definida a lo largo del tiempo.

Teniendo en cuenta el porcentaje respecto a P1 (agregado no extraído en NaCl 0,6 M) de proteína extraída en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (fracción S3, figuras 4.13. a 4.16), los resultados indican que en músculo picado de bacalao y merluza hubo un aumento en la cantidad de Ac extraída de 100g de P1 en esta fracción a lo largo del tiempo de conservación. Sin embargo, no hubo cambios en los demás lotes.

En general, los resultados sugieren que en filetes de bacalao la implicación de la Ac y CPM en la formación de enlaces S-S en el agregado permaneció constante al aumentar el tiempo de conservación, mientras que en músculo picado de la misma especie se produjo un aumento, especialmente de la CPM. Este aumento fue detectado también en merluza, aunque la intensidad del mismo pudo ser mayor que la observada, debido al aumento en la formación de enlaces covalentes (figura 4.15.). Por este mismo motivo, en bacaladilla no se pudo inferir nada acerca de los cambios en la participación de estas proteínas en las uniones S-S a lo largo de la conservación (figura 4.16.).

### Perfiles electroforéticos

En la figura 4.28. se pueden observar los perfiles electroforéticos correspondientes a la fracción S3 obtenida en semana 49 de conservación en los lotes de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente). Los perfiles observados en los demás controles en estos lotes fueron similares. En la figura 4.29. se representan los perfiles electroforéticos de la proteína extraída en S3 en los lotes de merluza (M) y bacaladilla (A) a las 5 y 49 semanas de conservación en congelación.

**S3**

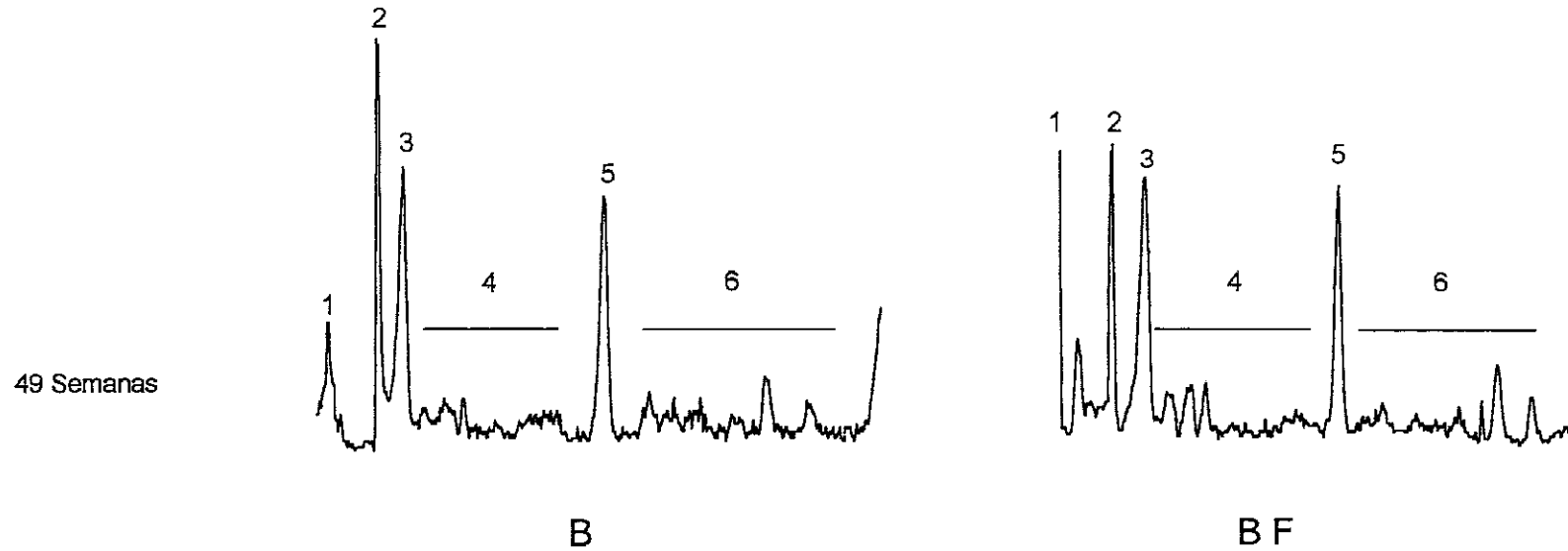


Figura 4.28.— Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de la proteína extraída en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) en la semana 49 de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . BF, B: lotes de filetes y músculo picado de bacalao respectivamente. Identificación de picos y zonas en el apartado 4.1.1.



S3

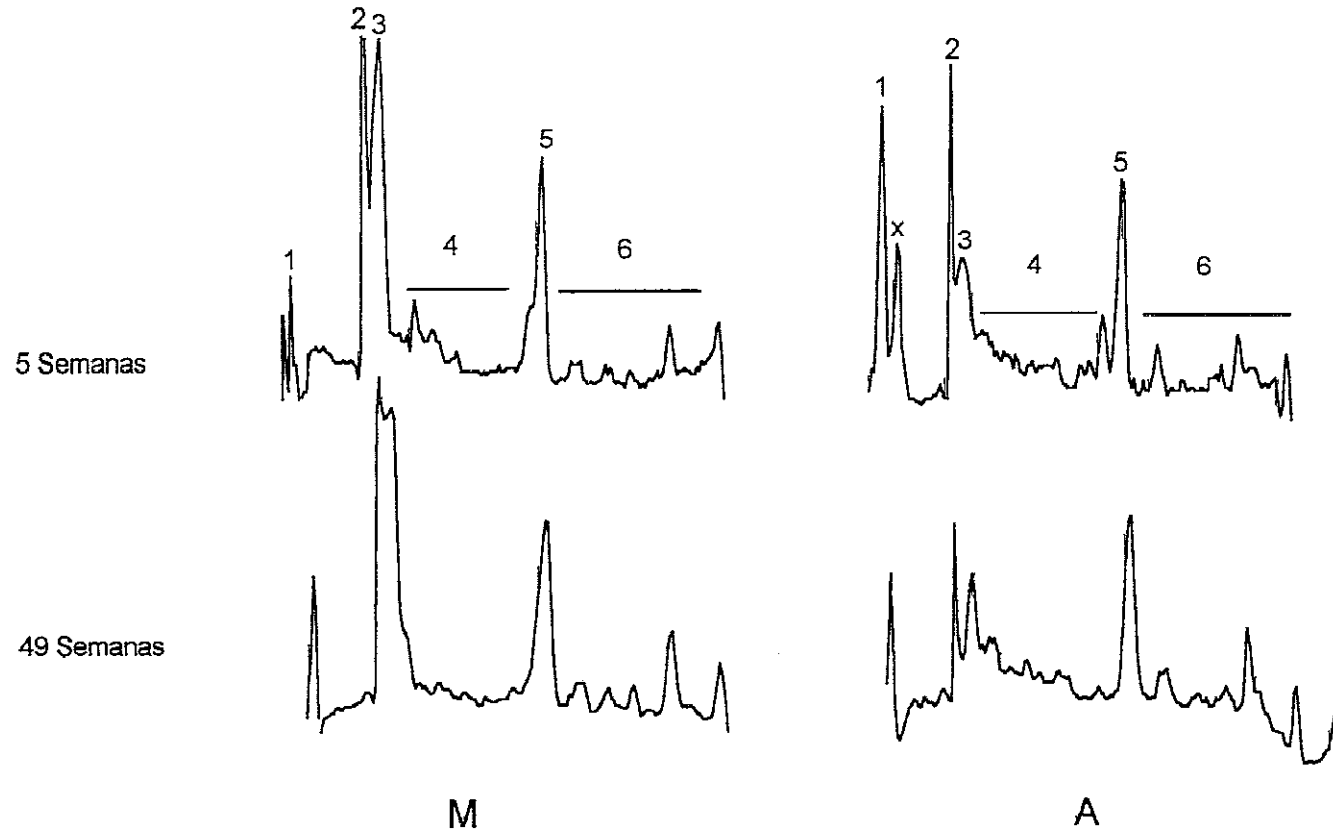


Figura 4.29.- Perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) de la proteína extraída en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) en las semanas 5 y 49 de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . M y A: lotes de músculo picado de merluza y bacaladilla respectivamente. Identificación de picos y zonas en el apartado 4.1.1.

Como ya se ha indicado, en bacalao no se observaron cambios a lo largo del tiempo. En merluza tampoco se observaron cambios importantes a lo largo del tiempo. En bacaladilla se detectaron inicialmente agregados que no entraron en el gel (pico 1) y que si entraron, observándose en el stacking gel (pico x). Al igual que sucedió en S1 en esta misma especie, al final de la conservación (semana 49) el pico 1 disminuyó. Tampoco se observó al final de la conservación la presencia de agregados en el gel de concentración, lo cual podría deberse al aumento del tamaño de los mismos. Estos resultados son similares a los encontrados por Lim y Haard (1984), quienes observaron la presencia de una banda de PM elevado al tratar con SDS 4% +  $\beta$ -ME 5% el agregado insoluble en sal obtenido durante la conservación a  $-10^{\circ}\text{C}$  de músculo picado de cglefino. Dichos autores atribuyeron esta banda a la presencia de agregados covalentes en la fracción soluble en SDS 4% +  $\beta$ -ME 5%. También Matthews y col. (1979) observaron la aparición de esta banda en la fracción obtenida al extraer con SDS 4% +  $\beta$ -ME 5% músculo picado de bacalao conservado a  $-7^{\circ}\text{C}$  durante 85 días.

#### 4.4.3.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DISTINTAS FRACCIONES (S1, S2, S3) EXTRAIDAS EN CADA LOTE (B, BF, M, A)

Para complementar los resultados obtenidos en el estudio de solubilidad se quiso estudiar la implicación de las proteínas miofibrilares mayoritarias (CPM y Ac) en los enlaces covalentes no S-S que participan en la agregación. Para ello se compararon en cada lote, los valores de DOI/g prot. de la CPM y Ac extraídas en los distintos sobrenadantes a lo largo de la conservación.

#### Cambios en la DOI de los picos de CPM y Ac en los Densitogramas de proteínas extraídas de Bacalao (filetes y músculo picado)

En las figuras 4.30. se representa la proporción de CPM y Ac, medida a través de los valores de DOI/g prot., en las fracciones S1, S2 y S3 extraídas de músculo picado y filetes de bacalao respectivamente. El estudio estadístico mostró que los valores fueron significativa-

mente superiores en las fracciones S2 y S3 (tablas 4.17. y 4.18.). Esta diferencia se puede explicar por la riqueza en CPM y Ac del agregado P1. Sin embargo, la proporción de CPM y Ac en S2 y S3 fueron inferiores al valor inicial de S1, lo cual indica que parte de las CPM y Ac quedaron enriqueciendo al agregado P3 o bien no se cuantificaron porque formaron parte de agregados de naturaleza covalente no S-S solubilizados en las distintas fracciones. Estos agregados se han observado en los perfiles electroforéticos en las fracciones S2 y S3.

Además, en músculo picado y filetes la proporción de CPM tendió a disminuir en S1 y S2 respectivamente en la semana 49. Esto sugiere un enriquecimiento en CPM de P1 en músculo picado y de P2 en filetes al aumentar el tiempo de conservación, por lo que cabría esperar un aumento de la proporción de CPM extraída en las fracciones S2 o S3 a lo largo del mismo periodo de tiempo. Sin embargo los valores se mantienen constantes, por lo que se podría inferir que en ambos lotes de bacalao tuvo lugar un aumento de la proporción de CPM que participa en la formación de agregados covalentes no S-S.

#### Cambios en la DOI de los picos de CPM y Ac en los Densitogramas de proteínas extraídas de músculo picado de merluza y bacaladilla

En la figura 4.31. se comparan los datos de DOI/g prot. de CPM y Ac respectivamente en las tres fracciones (S1, S2 y S3) obtenidas de músculo picado de merluza (M) y bacaladilla (A). Las tablas 4.19. y 4.20. muestran el análisis estadístico correspondiente a ambos lotes. En merluza, los valores de DOI de CPM obtenidos en S1 fueron generalmente inferiores a los obtenidos en S2 y S3 (excepto en la semana 5, donde fueron similares). Al igual que en bacalao, esto indicaría una mayor concentración de CPM en P3. Además, la proporción de CPM fue disminuyendo, mientras que en S2 y S3 se mantuvo constante, con lo que las diferencias entre S1 y S2 o S3 aumentaron. Esto pudo deberse a que parte de la CPM no se cuantificó debido a su implicación en enlaces covalentes no S-S que fueron extraídos en las distintas fracciones o bien a que quedó en mayor proporción en el agregado P3.

## SDS-PAGE

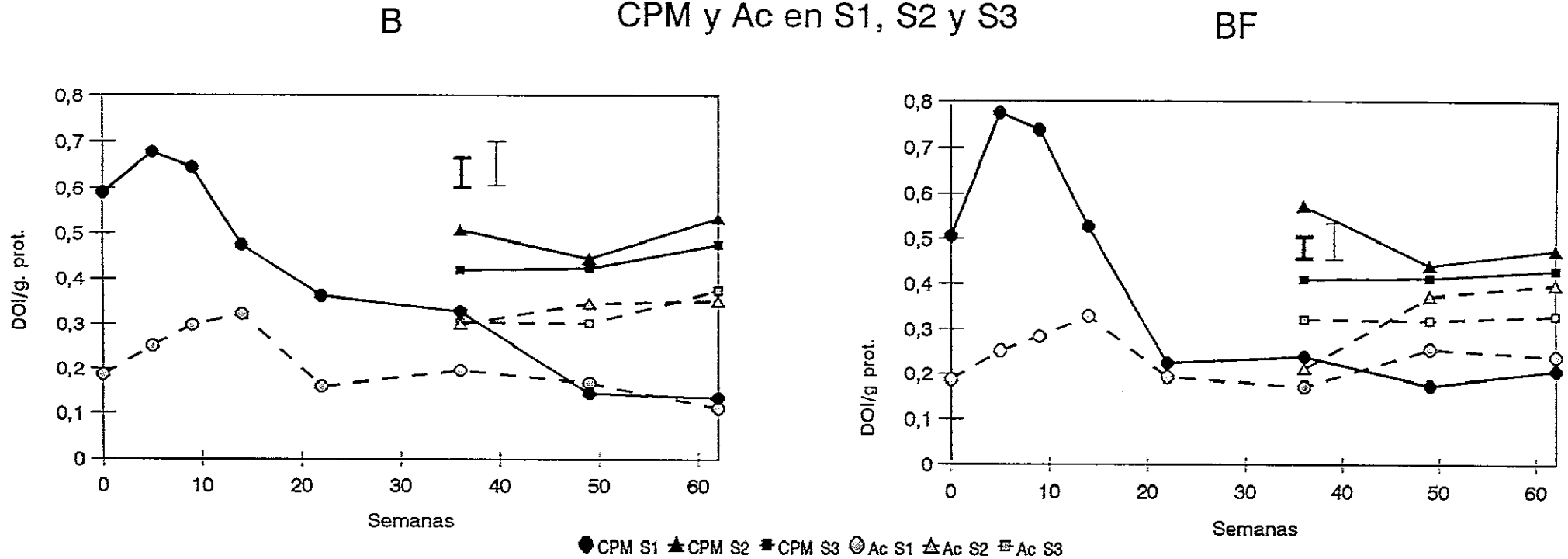


Fig. 4.30.- Evolución de la densidad óptica integrada (DOI) de las bandas de cadena pesada de miosina (CPM) y actina (Ac) (DOI/g prot.) de la proteína extraída en NaCl 0,6 M (S1); SDS 2% (S2) y SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3). BF: filetes de bacalao; B: músculo picado de bacalao. Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95% del análisis de varianza en función del sobrenadante. La de trazo grueso corresponde al análisis de los valores relativos a CPM y la de trazo fino al de los relativos a Ac.

	TIEMPO	SOBRENADANTE	TIEMPO x S
CPM	***	***	***
Ac	-	***	*

Tabla 4.17. - Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot. de las bandas de la cadena pesada de la miosina (CPM) y actina (Ac) obtenidas de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en los sobrenadantes S1 (NaCl 0,6 M), S2 (SDS 2%) y S3 (SDS 2% +  $\beta$ -ME 5%) de músculo picado de bacalao (B) en función del sobrenadante (S) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	SOBRENADANTE	TIEMPO x S
CPM	***	***	**
Ac	***	***	**

Tabla 4.18. - Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot. de las bandas de la cadena pesada de la miosina (CPM) y actina (Ac) obtenidas de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en los sobrenadantes S1 (NaCl 0,6 M), S2 (SDS 2%) y S3 (SDS 2% +  $\beta$ -ME 5%) de filetes de bacalao (BF) en función del sobrenadante (S) y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x S = Interacción entre el efecto del tiempo y el sobrenadante

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

En cuanto a la DOI/g prot. de la Ac, se observaron diferencias entre significativas entre S1 Y S2 durante las primeras 22 semanas de conservación, siendo los valores de S2 inferiores. S3 presentó valores intermedios. Al final de la conservación los valores en las tres fracciones se igualaron al descender los de S1. Este descenso implica un enriquecimiento en Ac de P1. Al no extraerse en S2 o S3 esta Ac "en exceso" en P1, se puede inferir que esta quedó sin cuantificar por pasar a formar agregados covalentes no S-S extraídos en las distintas fracciones o bien no pudo ser extraída y quedó enriqueciendo agregado P3.

Por tanto, en merluza la CPM y Ac no pudieron ser extraídas en S2 y S3 en la misma concentración en que se encontraban agregadas en P1, quedando así el precipitado P3 enriquecido en las mismas y mayormente en CPM. Además, esta mayor implicación de la CPM y Ac en enlaces covalentes se fue acentuando con el tiempo.

En el caso de la bacaladilla (figura 4.31., A) se observó una tendencia a la disminución en DOI/g prot. de CPM similar en los tres sobrenadantes. Esto quiere decir que en esta especie, al igual que en los otros lotes, P3 tiene mayor concentración de CPM. Además, se produjo un enriquecimiento de P3 en CPM que fue más importante que en las otras especies, por que en este lote la DOI/g prot. de CPM en S2 y S3 no sólo no aumenta sino que disminuye a lo largo de la conservación. En la misma figura (4.31., A) se puede ver que los valores de DOI de Ac de S2 fueron significativamente superiores a los observados en S1 y S3, aunque no se produjo un enriquecimiento en Ac del P1, ya que la DOI/g prot. de S1 no cambió. Esto indica que en bacaladilla la Ac es más susceptible de ser extraída del agregado con SDS 2% que en las otras especies. Por tanto en este caso el P3 no está enriquecido en Ac, sino que presenta menor concentración de la misma.

En general, en bacaladilla se produjo una agregación en la que intervinieron fundamentalmente la CPM y Ac, sin embargo a pesar de la mayor concentración respecto a S1 de CPM en el agregado P1, este "exceso" de CPM no se extrajo en S2 o S3 con lo que, al igual que en merluza, P3 estuvo enriquecido en CPM y dicho enriquecimiento aumentó al aumentar el periodo de conservación.

## SDS-PAGE

### CPM y Ac en S1, S2 y S3

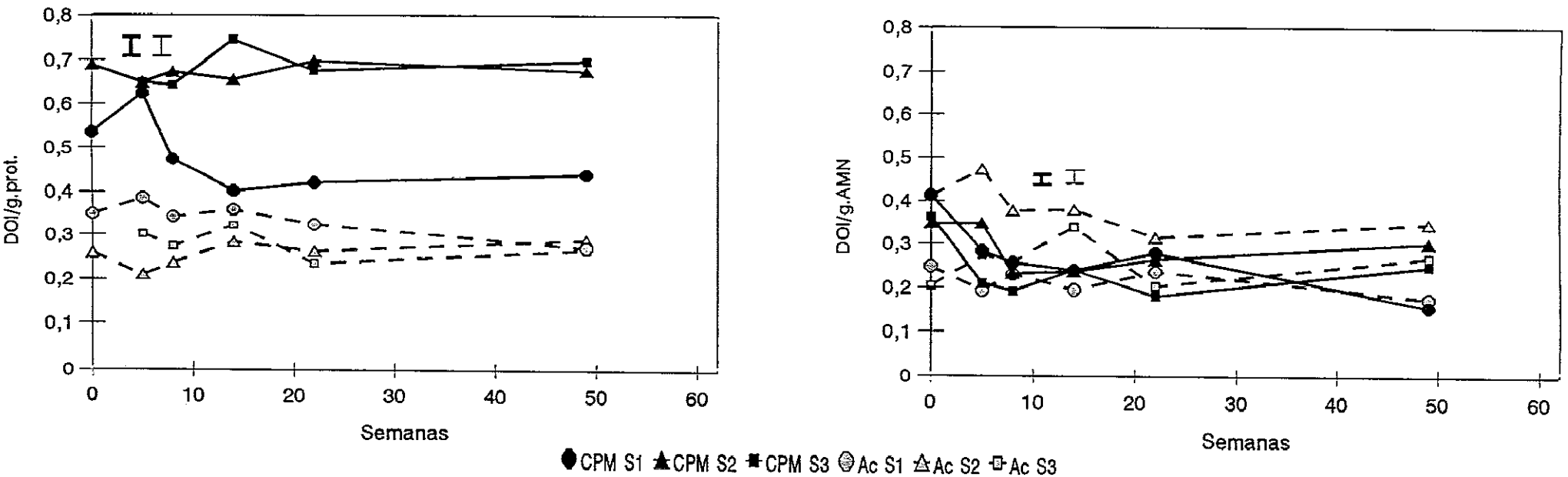


Fig. 4.31.- Evolución de la densidad óptica integrada (DOI) de las bandas de cadena pesada de miosina (CPM) y la actina (Ac) (DOI/g prot.) de la proteína extraída en NaCl 0,6 M (S1); SDS 2% (S2) y SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3). M: músculo picado de merluza; A: músculo picado de bacaladilla.

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95% del análisis de varianza en función del sobrenadante. La de trazo grueso corresponde al análisis de los valores relativos a CPM y la de trazo fino al de los relativos a Ac.

	TIEMPO	SOBRENADANTE	TIEMPO x S
CPM	***	***	***
Ac	***	***	***

Tabla 4.19. - Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot. de las bandas de la cadena pesada de la miosina (CPM) y actina (Ac) obtenidas de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en los sobrenadantes S1 (NaCl 0,6 M), S2 (SDS 2%) y S3 (SDS 2% +  $\beta$ -ME 5%) de músculo picado de merluza (M) en función del sobrenadante (S) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	SOBRENADANTE	TIEMPO x S
CPM	***	***	***
Ac	***	***	***

Tabla 4.20. - Análisis de la varianza correspondiente a las medidas de la densidad óptica integrada (DOI)/g prot. de las bandas de la cadena pesada de la miosina (CPM) y actina (Ac) obtenidas de las electroforesis de la actomiosina natural (AMN) aislada en los sobrenadantes S1 (NaCl 0,6 M), S2 (SDS 2%) y S3 (SDS 2% +  $\beta$ -ME 5%) de músculo picado de bacaladilla (A) en función del sobrenadante (S) y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x S = Interacción entre el efecto del tiempo y del sobrenadante

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo



A la vista de los resultados obtenidos se puede inferir que la CPM y Ac intervienen fundamentalmente en la agregación. Estas proteínas son pues las mayoritarias en P1. El tratamiento de P1 con las distintas soluciones (S2 y S3) no se extrajo CPM y Ac en proporción lo suficientemente alta de acuerdo con ese enriquecimiento de P1 en las mismas. Por tanto, en las tres especies se puede inferir que la concentración de CPM y Ac en P3 fue superior a la observada en P1 y, por tanto, en S1. Además, se puede deducir que hubo un aumento en la proporción de CPM en P3 al aumentar el periodo de conservación. Esto fue especialmente evidente en bacaladilla y se puede interpretar como que la CPM se va implicando cada vez más en la formación de enlaces covalentes a medida que avanza el periodo de conservación en congelación.

#### 4.5.- MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION (MET)

Se analizó la fracción de AMN extraída en NaCl 0,6 M (S1) y los agregados (P1, P2 y P3) obtenidos en el estudio de extractabilidad (apartado 3.2.3.) de músculo picado de bacalao. Unicamente se muestran fotografías de la fracción S1 y del agregado P3, debido a que en ellas se observaron los cambios más interesantes para el estudio de la naturaleza de la desnaturalización y agregación de proteínas miofibrilares a lo largo de la conservación. El estudio completo se encuentra pendiente de publicación (Tejada y col., 1996), con lo que nos hemos remitido a este trabajo cuando a lo largo de la discusión se hace mención a algunos de los cambios observados sin mostrar fotografía.

##### Morfología de la fracción S1

La figura 4.32. muestra la fracción S1 a las 36 (a) y 49 (b) semanas de conservación. A las 36 semanas se observaron filamentos de Ac más cortos que los observados en AMN fresca (Tejada y col., 1996) interconectados con estructuras globulares por medio de puentes transversales (\*). También se observaron microagregados de estructura globular (►). Jarenbäck y Liljermark (1975) encontraron una ultraestructura similar en músculo de bacalao conservado

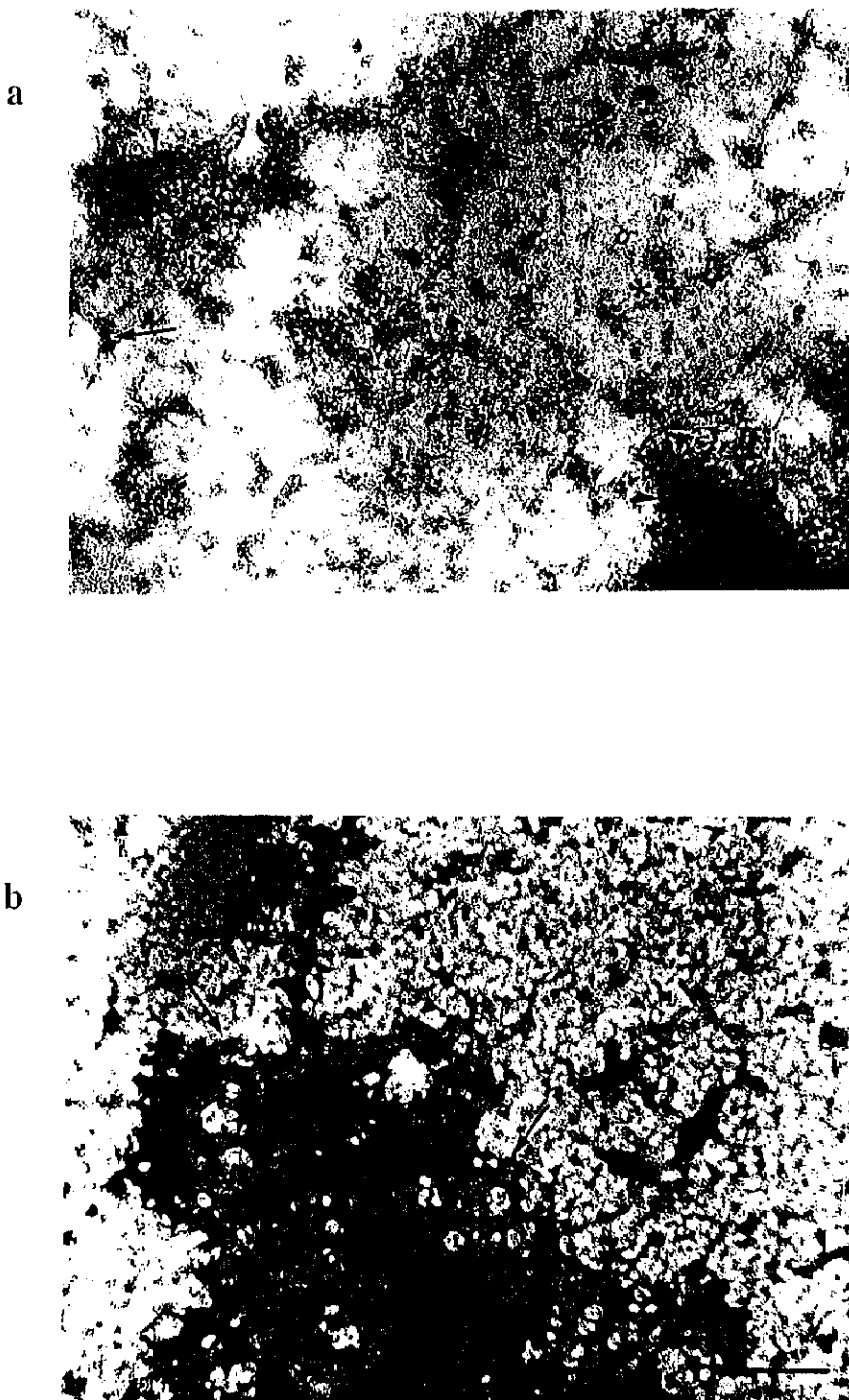


Figura 4.32.- Actomiosina natural aislada en NaCl 0,6 M de músculo picado de bacalao conservado en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  (B) durante 36 (a) y 49 (b) semanas.  
a: Se observan estructuras incipientes en forma de anillo ( $\rightarrow$ ); b: Se observa más abundancia de estructuras en forma de anillo ( $\rightarrow$ ). Tamaño de la barra 0,4  $\mu\text{m}$ .

en congelación. Asimismo se detectó entrecruzamiento de filamentos formando ángulos de aproximadamente  $106^{\circ}\text{C}$  que sugieren la intervención de enlaces covalentes ( $\rightarrow$ ). A las 49 semanas (b) se observaron filamentos sueltos de una longitud aproximada de  $1\mu\text{m}$  junto con estructuras en forma de anillo y microagregados mayores que los detectado a las 36 semanas (a).

En general, la microscopía electrónica de transmisión mostró que la morfología de la AMN extraída en  $\text{NaCl } 0,6 \text{ M}$  de músculo picado de bacalao tendió a alterarse con la formación de agregados cada vez más grandes y filamentos cada vez más cortos. En estos agregados pueden estar interviniendo enlaces covalentes, aunque no se pudo determinar la importancia de su participación.

### Morfología de los agregados (P1, P2 y P3)

El agregado P1 mostró en la semana 22 de conservación una estructura que recuerda al sarcómero, aunque no se observó línea Z y en la línea H no aparecieron filamentos gruesos de miosina. En la semana 36 se observó una estructura similar, apareciendo la banda A más intacta y distinguiéndose una línea Z desorganizada. Tras el tratamiento de P1 con SDS 2%, el agregado P2 obtenido en la semana 36 mostró menor cantidad de proteína en la banda A respecto a P1 y la desaparición de la línea Z. Sin embargo, aún presentó una estructura que recuerda la del sarcómero (Tejada y col., 1996).

En la figura 4.33. a se muestra el agregado P3 obtenido a las 36 semanas de conservación. Este mantuvo únicamente un residuo de la estructura del sarcómero que se observó en P1 y P2 (Tejada y col., 1996), aunque estaba totalmente desestructurado tras la extracción de P2 con SDS 2% +  $\beta$ -ME 5%.

A las 62 semanas de conservación se observó en todos los agregados (P1, P2 y P3) una estructura que recordaba más a la del sarcómero que la observada en la semana 36. La figura 4.33. b muestra el agregado P3 a las 62 semanas de conservación. En ella se puede

a



b

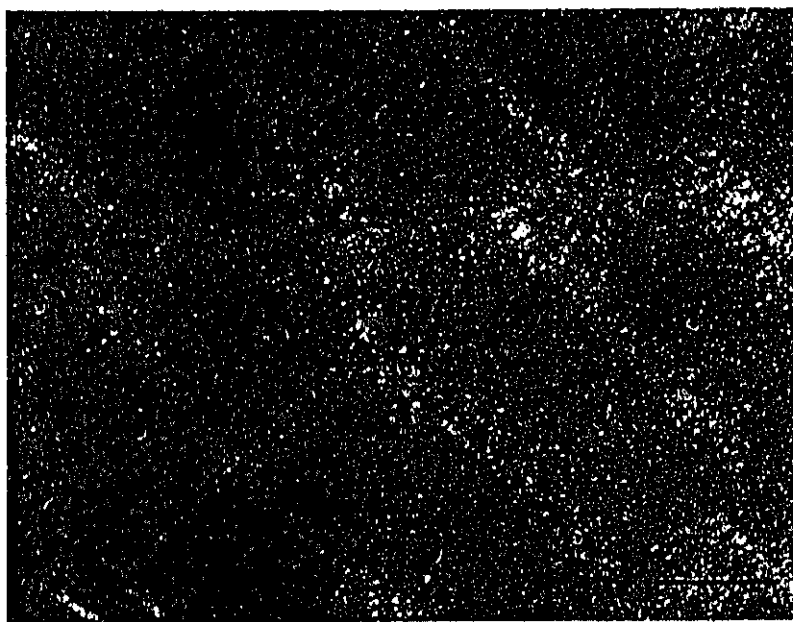


Figura 4.33.- Agregado proteico inextractable con el tratamiento aplicado (P3) obtenido de músculo picado de bacalao conservado en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  (B) durante 36 (a) y 62 (b) semanas. a: La estructura del sarcómero está totalmente destruida. Destaca la escasez de proteína en la banda A; b: La estructura del sarcómero se mantiene, aunque la banda A está desorganizada. Se observa que la cantidad de proteína en la banda A es mayor que en a. Tamaño de la barra  $0,4\text{ }\mu\text{m}$ .

observar que el residuo tuvo una estructura que recuerda al sarcómero incluso después del tratamiento con SDS 2% +  $\beta$ -ME 5%.

En general, en las primeras etapas de la detección de agregado, el tratamiento del mismo con los distintos agentes permitió extraer mucha cantidad de miosina y Ac del mismo y ello da lugar a pérdida de la estructura del sarcómero, mayormente cuando se empleó SDS 2% +  $\beta$ -ME 5%. Sin embargo, al avanzar el tiempo de conservación se observaron bandas A más estructuradas incluso tras el tratamiento con SDS 2% +  $\beta$ -ME 5%. Estos resultados apoyan lo observado en el estudio electroforético (apartado 4.4.) al sugerir que a medida que aumenta el tiempo de conservación se observó un enriquecimiento de P1 y P3 en miosina.

#### **4.6.- ANALISIS EN LA FRACCION EXTRAIDA EN NaCl 0,6 M (S1)**

##### **4.6.1.- CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL**

El estudio de la AMN aislada en sal (S1) por medio de cromatografía en gel-filtración nos permite identificar y separar proteínas por su peso molecular así como detectar la posible agregación de la proteína en dicha fracción S1, sin que esta haya sufrido ninguna alteración como sucede durante el tratamiento de la muestra para electroforesis.

Como se ha indicado en el apartado 4.5., en los extractos de AMN en NaCl 0,6 M de músculo picado de bacalao se detectaron por microscopía electrónica agregados así como un aumento del tamaño de estos al aumentar el tiempo de conservación. Por otro lado, en los geles de electroforesis no se observaron agregados en esta fracción (figura 4.20.). Teniendo en cuenta las condiciones de preparación de la muestra para electroforesis, que producen ruptura de interacciones secundarias y reducción de los grupos S-S, los resultados sugieren que la naturaleza de la agregación observada puede deberse al establecimiento de interacciones secundarias y/o S-S interproteicos fundamentalmente. El análisis de la AMN por cromatografía de gel filtración tuvo como objeto complementar el estudio por microscopía electrónica

(apartado 4.5.) por medio de la observación de los cambios en tamaño de las especies moleculares que componen la AMN extraída a lo largo de la conservación. De esta manera se pudo obtener más información acerca de la naturaleza de la agregación detectada por microscopía electrónica en la AMN extraída en NaCl 0,6 M.

### Estudio del patrón cromatográfico de la AMN

Para identificar los distintos picos que aparecen en el cromatograma de AMN y su evolución en el tiempo, se realizó un estudio preeliminar de AMN procedente de bacalao fresco. Se eligió esta especie por que su patrón cromatográfico presentó más claramente diferenciados todos los picos que el de merluza o bacaldilla. La proteína recogida en cada uno de los picos obtenidos en el cromatograma se analizó por electroforesis (SDS-PAGE).

En la figura 4.3-4. se muestra el cromatograma de AMN de bacalao fresco. En este se aprecian claramente cuatro picos; cuyos pesos moleculares corresponderían a más de 2.000 kDa para el pico 1, alrededor de 1.500 kDa para el pico 2, de 600 a 700 kDa para el pico 3 y de 355 a 100 kDa para el pico 4. Estos pesos moleculares se calcularon de acuerdo con proteínas globulares patrones, mientras que la AMN es fibrilar, por lo que no consideramos que estos sean exactos. Debido a esto, en los estudios por cromatografía de gel filtración de AMN que se encuentran en la literatura, no se hace mención a los pesos moleculares (Umemoto y col., 1971; Seki y Arai, 1974; Ohnishi y Rodger, 1979)

Para identificar las proteínas que forman parte de cada uno de los picos obtenidos, se recogieron las fracciones de cada uno de estos y se sometieron a electroforesis, tiñiendo los geles con plata. El pico 1 del cromatograma presentó en su composición principalmente CPM y Ac, el resto de las proteínas no se identificaron con tanta claridad. De acuerdo con Umemoto y col., 1971 y Seki y Arai, 1974, este pico correspondería a actomiosina. En el pico 2 se diferenciaron miosina, Ac, TM y proteínas de menor peso molecular. Seki y Arai (1974) y Wakameda y Arai (1986) observaron un pico compuesto por miosina en una posición similar al pico 2, pero más definido que el observado por nosotros. Teniendo esto en cuenta, se podría

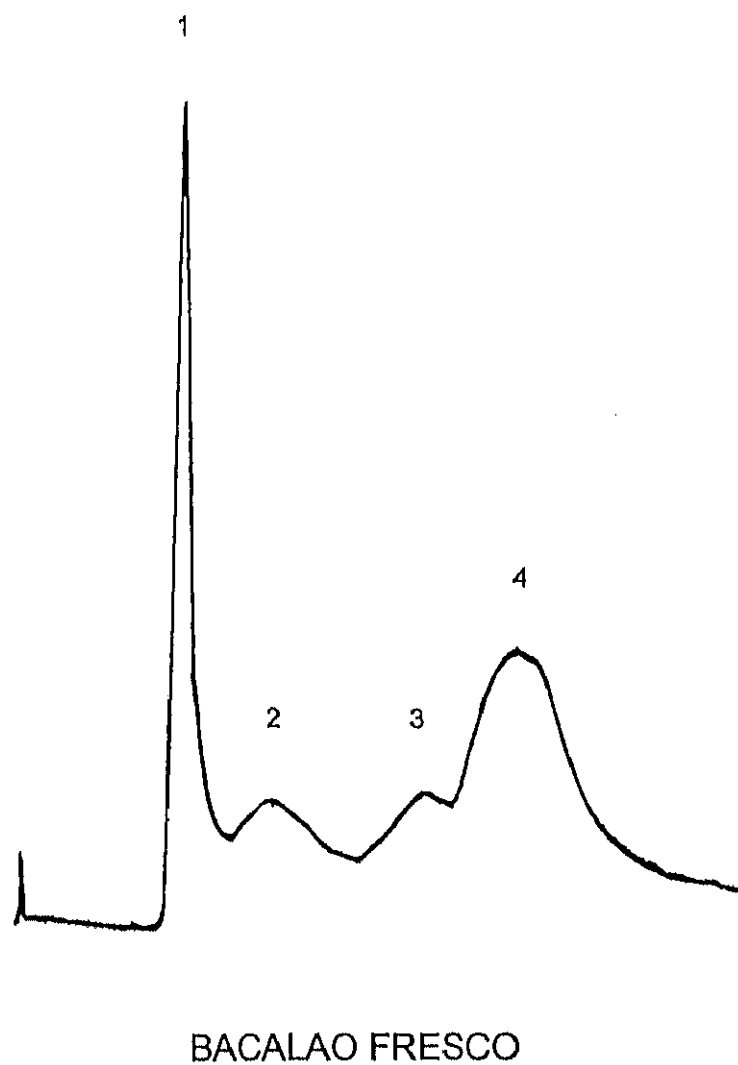


Fig. 4.34.- Cromatograma de filtración en gel de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M de músculo de bacalao fresco. Identificación de picos en apartado 4.6.1.

inferir que el pico 2 corresponde a miosina, aunque debido a las condiciones empleadas en el presente estudio, este no se resuelve totalmente. En los picos 3 y 4 se aisló fundamentalmente Ac y TM, apareciendo también otras de menor peso molecular que se encuentran en el rango de las TN y CLM. Otros autores han detectado picos en posición similar a los pico 3 y 4 y compuestos por las mismas proteínas (Seki y Arai, 1974 y Wakameda y Arai, 1986).



# Estudio de los cromatogramas de los distintos lotes y sus cambios a lo largo de la conservación

En la tabla 4.21. se detallan los porcentajes de los picos 1, 3 y 4 de los cromatogramas de la AMN extraída de los distintos lotes a lo largo de la conservación. El pico 2 no se pudo cuantificar.

LOTE	SEMANA	PICO 1	PICO 2	PICO 3	PICO 4
BACALAO FRESCO	0	24,42	10,67	14,62	50,25
BACALAO MUSCULO PICADO (B)	0	61,60	8,90	—	29,46
	5	63,00	7,20	—	29,80
	8	71,55	—	—	28,90
	14	63,88	—	—	36,11
	22	51,60	—	—	48,60
	36	11,93	—	—	88,07
BACALAO FILETES (BF)	0	62,30	8,50	—	29,20
	49	57,37	—	—	42,62
MERLUZA MUSCULO PICADO (M)	0	55,58	10,35	12,13	17,38
	22	69,60	13,99	—	22,64
	49	45,17	—	—	52,45
BACALADILLA MUSCULO PICADO (A)	0	73,69	14,16	—	12,13
	22	80,65	—	—	19,34
	49	63,37	—	—	36,62

Tabla 4.21.

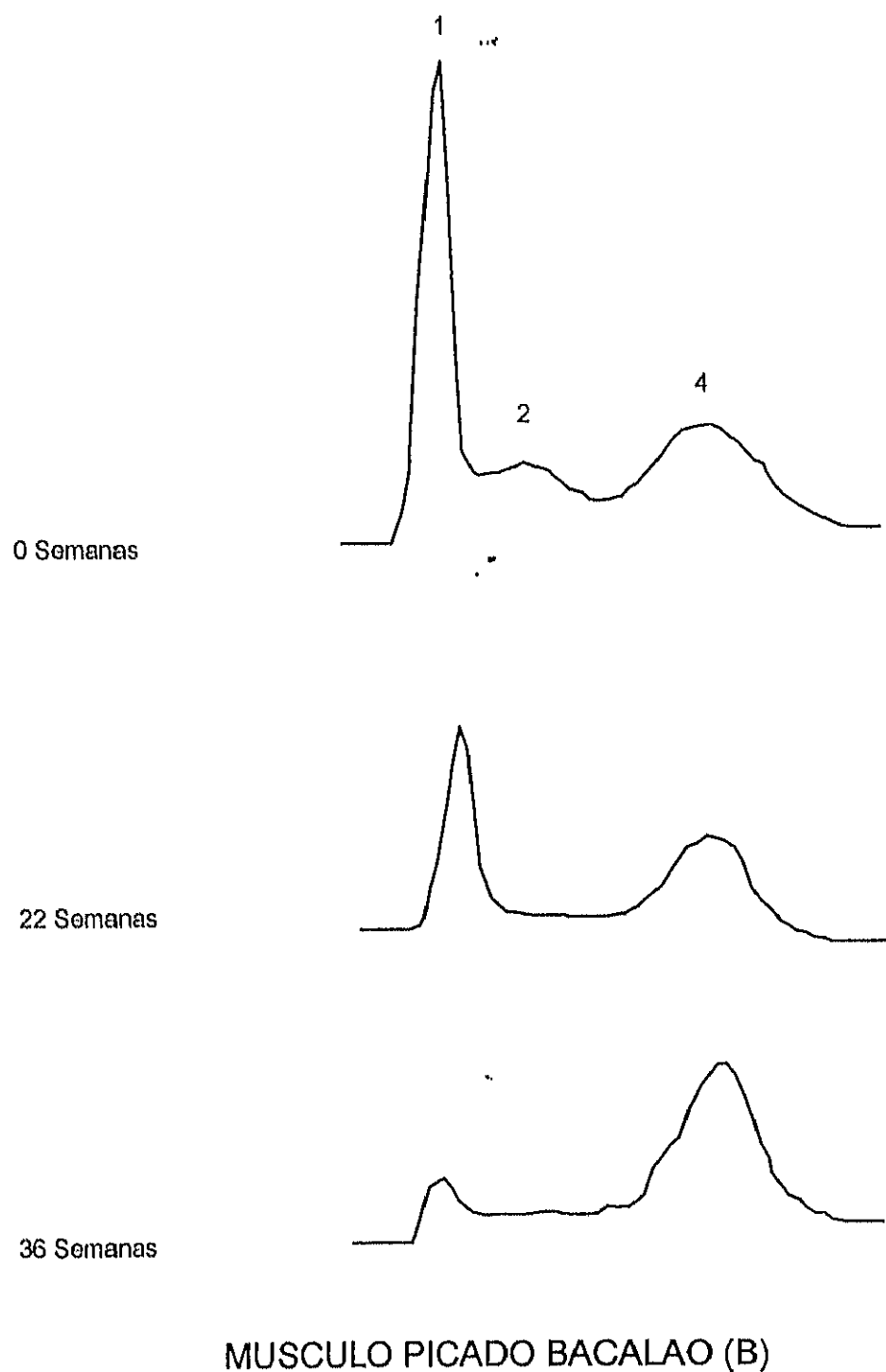


Fig. 4.35.- Cromatogramas de filtración en gel de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado de bacalao (B) a las 0, 22 y 36 semanas de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Identificación de picos en apartado 4.6.1.

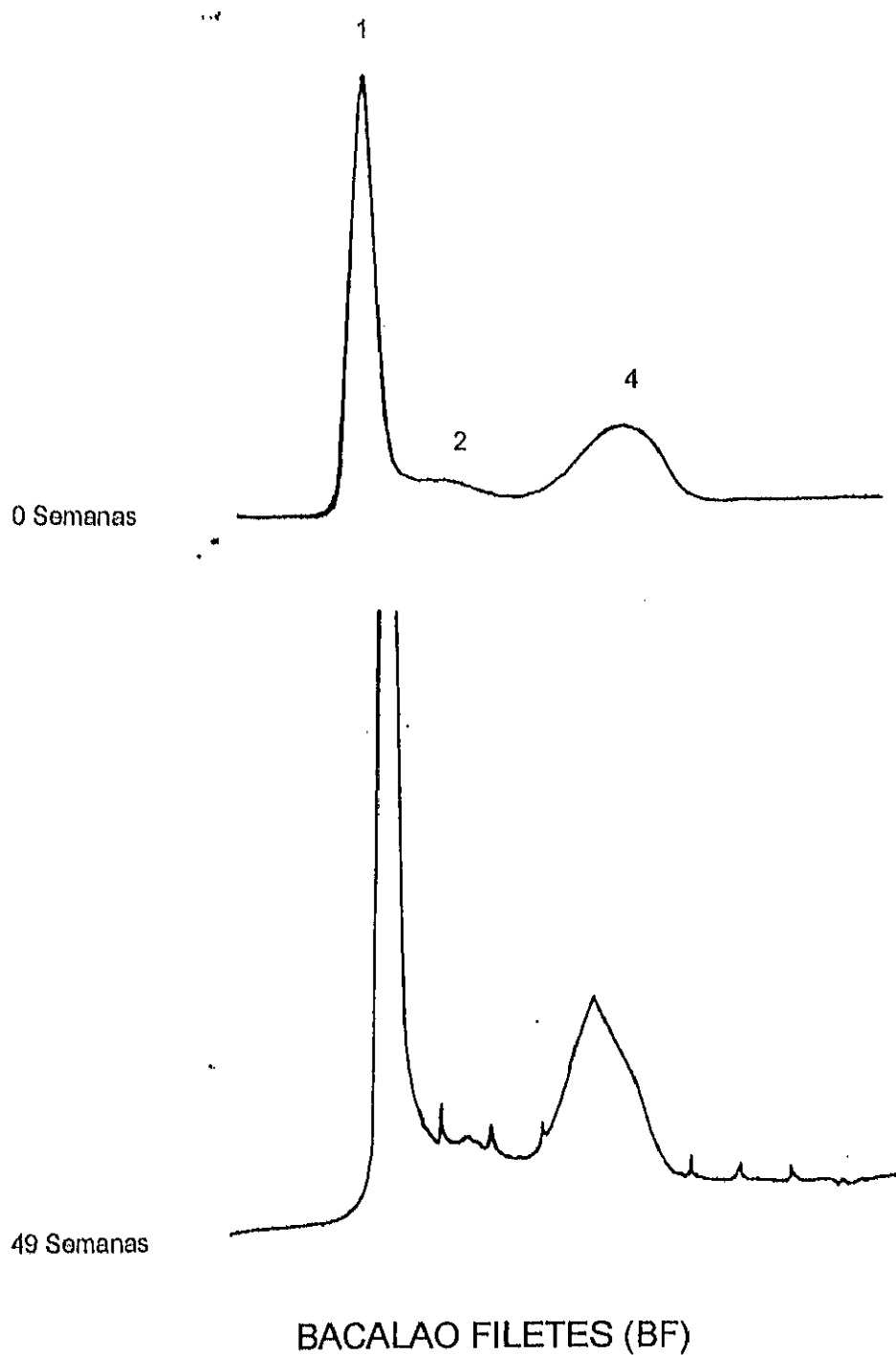


Fig. 4.36.- Cromatogramas de filtración en gel de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1) de filetes picado de bacalao (BF) a las 0 y 49 semanas de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Identificación de picos en apartado 4.6.1.

En la figura 4.35. se representan los perfiles de los cromatogramas correspondientes al lote de músculo picado de bacalao a las 0, 22 y 36 semanas de conservación. La figura 4.36. muestra los perfiles obtenidos del lote de filetes de bacalao a las 0 y 36 semanas de conservación. En ambos perfiles, el pico 2 fue menos evidente que lo observado en fresco (figura 4.33.). En nuestro laboratorio se realizaron estudios en los que se analizó por cromatografía de gel filtración la proteína que permanecía soluble en NaCl 0,6 M a lo largo de la conservación en congelación de AMN de tres especies (resultados no mostrados). En estos se observó un desplazamiento del pico 2 del cromatograma de la AMN soluble hacia zonas de mayor peso molecular al aumentar el tiempo de conservación. Posteriormente este pico 2 fue muy poco evidente o prácticamente inexistente. Paralelamente a estos cambios se observó un incremento del pico 1, por lo que se interpretó que tuvo lugar una agregación de las proteínas que componen el pico 2 (fundamentalmente miosina y Ac) dando especies moleculares de mayor peso que se eluyeron en el pico 1. De acuerdo con estas observaciones, las diferencias observadas en los perfiles iniciales de los lotes bacalao con respecto al perfil en fresco se podrían explicar por encontrarse la AMN en una etapa intermedia de este proceso en la cual las proteínas que se eluyen en el pico 3 en fresco han formado agregados de mayor tamaño. Debido a esto, el pico 3 no se observó en ninguno de los controles desde el inicio de la conservación y el pico 2, aunque se observó inicialmente, fue menos evidente que en fresco.

En la tabla 4.21. se observa que en músculo picado de bacalao hubo un aumento del pico 1 en la semana 8 de conservación acompañado de una desaparición del pico 2 (cromatograma no mostrado). Esto está de acuerdo con el mecanismo sugerido para explicar las diferencias iniciales con respecto al perfil en fresco. En este lote se observó un descenso en la proporción del área del pico 1 en la semana 22 que continuó hasta la semana 36. Teniendo en cuenta la composición del pico 1 y el pico 4 del cromatograma en fresco, esta tendencia final indica que a medida que transcurre la conservación la proteína extraída en S1 se enriqueció en pesos moleculares menores (Ac, TM, TN y CLM) en detrimento de la proporción de actomiosina. Esto concuerda con los cambios en composición de la AMN observados por electroforesis (figura 4.20.). Umemoto y col. (1971), en estudios por cromatografía de gel filtración con proteína miofibrilar extraída de surimi de abadejo de Alaska, encontró que la actomiosina (pico 1) decrecía a medida que aumentaba el periodo de

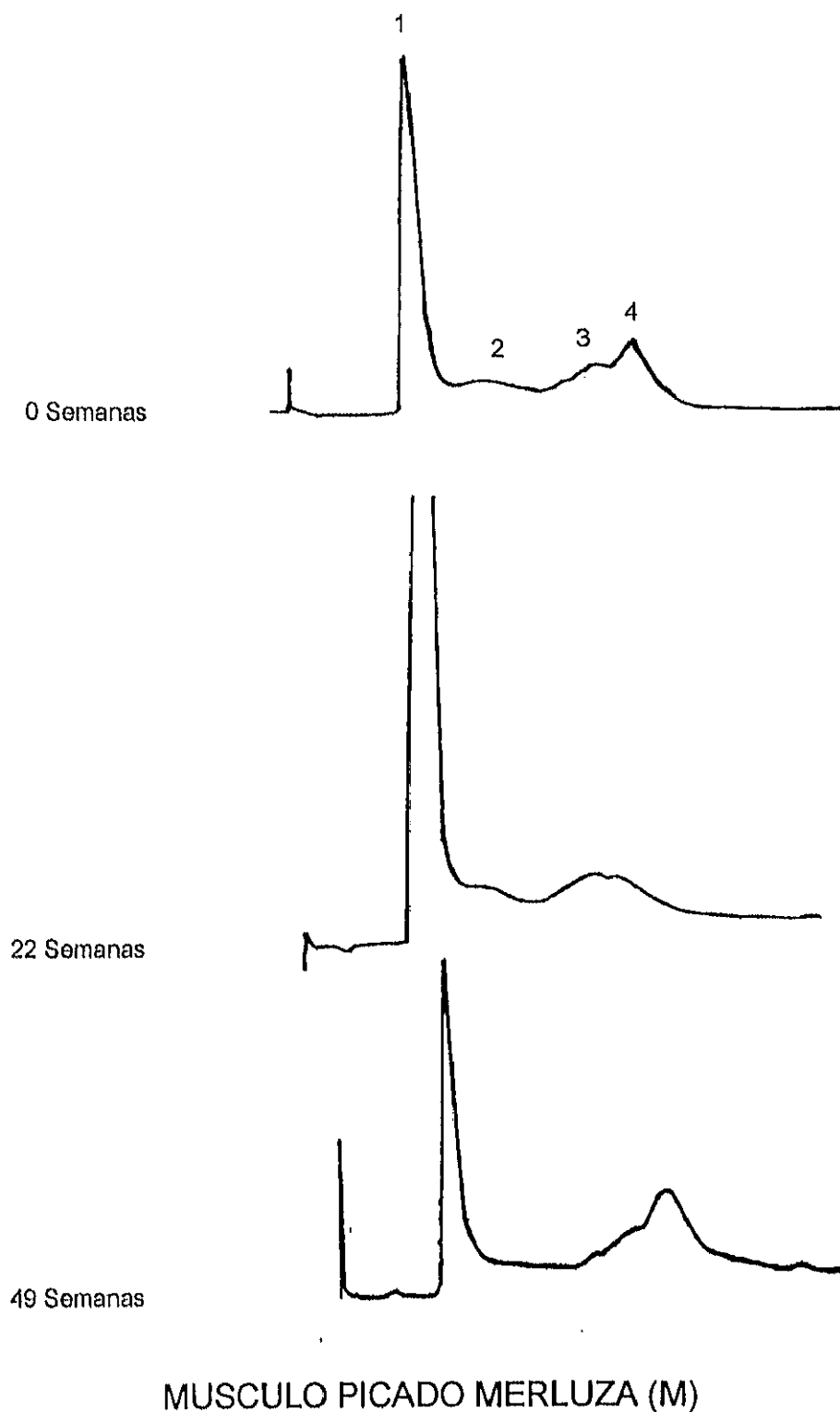
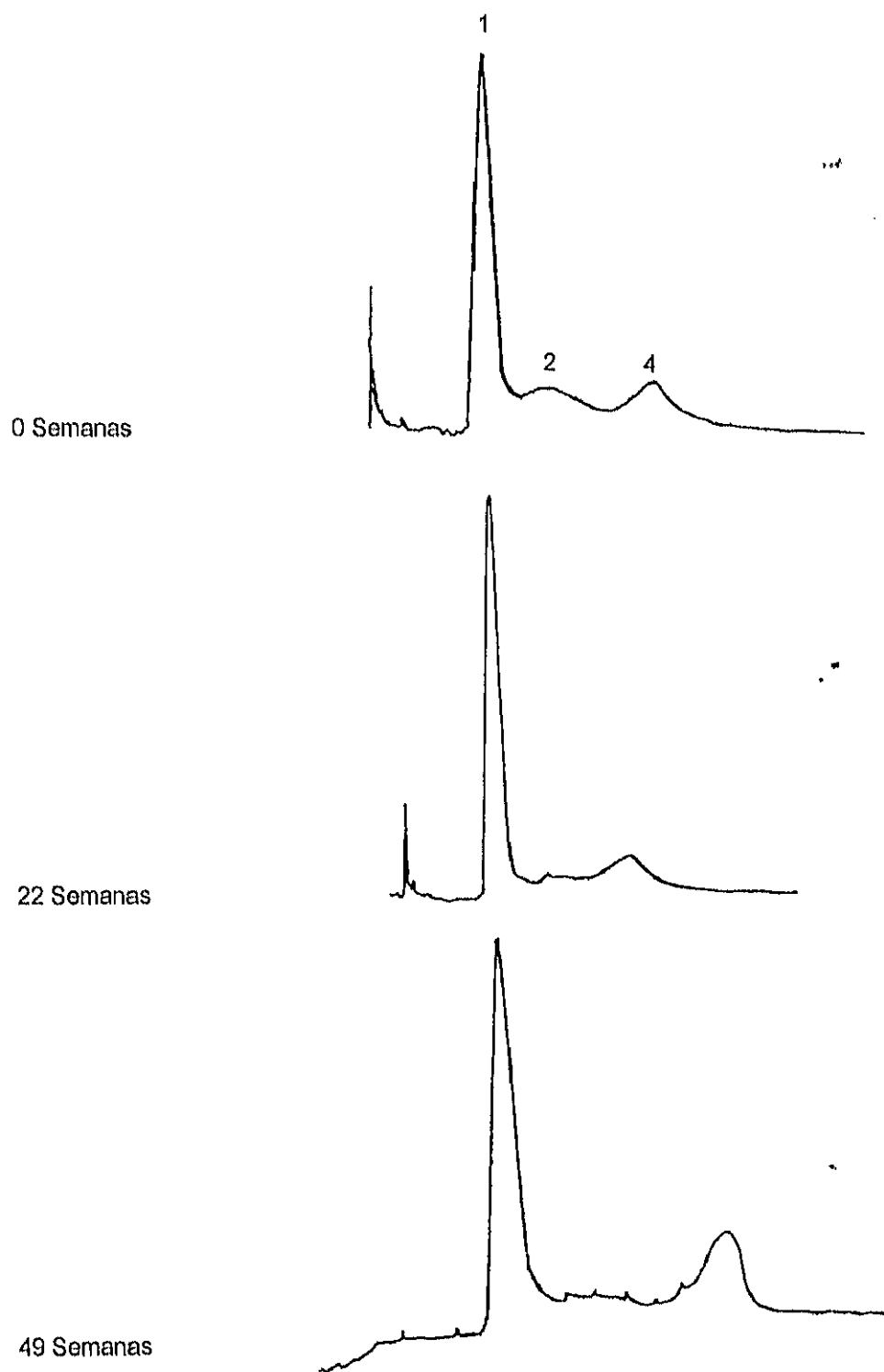


Fig. 4.37.- Cromatogramas de filtración en gel de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado de merluza (M) a las 0, 22 y 49 semanas de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Identificación de picos en apartado 4.6.1.

conservación, lo cual coincide con lo obtenido en el presente trabajo en músculo picado de bacalao. También en músculo picado de bacalao se observó un descenso en el área total del cromatograma. En músculo picado de bacalao, a diferencia de los demás lotes, no se ajustó la concentración de la muestra antes de inyectarla a la columna, por lo que esta disminución se debió probablemente a que la cantidad proteínica retenida en el proceso de filtrado aumentó entre las semanas 0 y 22 y no cambió entre las semanas 22 y 36. Esto podría ser debido a la agregación de la AMN a medida que aumenta el tiempo de conservación, lo concuerda con lo observado por microscopía electrónica (apartado 4.5.). Sin embargo, como ya se ha indicado, en los geles de electroforesis (figura 4.20.) no se detectó la presencia de agregados en la fracciones S1 de bacalao, por lo que se podría decir que estos agregados se formaron por interacciones secundarias y/o S-S. En ninguno de los restantes lotes se observó un aumento en la cantidad de proteína retenida en el filtro.

En el lote de filetes de bacalao (tabla 4.21. y figura 4.36.) no se observaron apenas cambios en la proporción de los picos 1 y 4 mayoritarios, aun cuando la proporción de miosina disminuyó en igual magnitud que en músculo picado de la misma especie (figura 4.18.). Esto se podría explicar por el aumento de la proporción de Ac observado también por electroforesis (figura 4.19.), ya que este podría enmascarar el descenso de la proporción de miosina, al ser eluidas ambas proteínas en el pico 1.

En la figura 4.37. se pueden observar los cromatogramas correspondientes al lote de músculo picado de merluza a las 0, 22 y 49 semanas de conservación. Al inicio de la conservación (figura 4.37., 0 Semanas) se observaron todos los picos detectados en el patrón en fresco. A las 22 semanas el pico 2 desapareció, apareciéndose un hombro en el pico 1 así como un aumento en el porcentaje del área de este último. Al final del periodo de conservación (figura 4.37., 49 semanas) se detectó un descenso en la proporción del pico 1. Estos cambios sugieren que, como se ha indicado en bacalao, a lo largo de la conservación por congelación, las proteínas que forman el pico 2 dieron lugar a pesos moleculares mayores que se eluyeron en el pico 1, lo cual explica el aumento de dicho pico en la semana 22 de conservación. El descenso posterior del pico 1 indicaría que la muestra se empobreció en miosina y Ac a lo largo de la conservación, lo cual coincide con lo observado en electroforesis



### MUSCULO PICADO BACALADILLA (A)

Fig. 4.38.- Cromatogramas de filtración en gel de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado de bacaladilla (A) a las 0, 22 y 49 semanas de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Identificación de picos en apartado 4.6.1.

(figuras 4.18. y 4.19.).

En la figura 4.38. se pueden observar los cromatogramas correspondientes al lote de bacaladilla picada a las 0, 22 y 49 semanas de conservación. En la tabla 4.21. se observa que el porcentaje del pico 1 fue inicialmente muy superior al observado en bacalao. Además, en la figura correspondiente (4.38., 0 semanas) se observó un pico 2 muy poco evidente. De acuerdo con el proceso sugerido anteriormente para explicar los cambios en bacalao y merluza, el cromatograma obtenido inicialmente en bacaladilla sugiere que las proteínas del pico 2 (miosina y Ac principalmente) formaron agregados que se eluyeron en el pico 1. Posteriormente hubo un descenso en la proporción del area total del pico 1 (tabla 4.21.) que podría explicarse, al igual que en bacalao y merluza, por el descenso en la proporción de miosina observado por electroforesis en S1 (figura 4.18.).

En todos los lotes se pudieron explicar los cambios observados en los perfiles cromatográficos por la agregación de la miosina y actina del pico 2 que así pasan a ser eluidas en el pico 1. En el pico 1, por tanto, podría eluirse tanto actomiosina como agregados de distintas proteínas.

Por otro lado, en todos los lotes parte de la proteína queda retenida en el filtro desde el inicio del periodo de conservación, indicando la presencia de agregados. Sin embargo, en el lote de músculo picado de bacalao, se encontró un aumento en la cantidad de proteína retenida durante el filtrado. Esto sugiere que en este lote tuvo lugar un mayor aumento en el tamaño de los agregados a lo largo de la conservación. En las etapas finales de la conservación se observó un descenso de la proporción del pico 1, lo cual podría deberse a que el tamaño de los agregados que se eluyen en este pico aumenta y pasan a la fracción P1, dando lugar a un enriquecimiento de los extractos en proteínas de bajo peso molecular, como se observó por electroforesis. En el caso de músculo picado de bacalao, estos agregados podrían haber sido solubilizados y posteriormente retenidos en el filtro, aumentando la cantidad total de proteína en el mismo.



#### 4.6.2.- ACTIVIDAD $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica

Diversos autores (Connell, 1960 c; Matsumoto, 1979, 1980; Tejada, 1979; Wagner y Añón, 1986) observaron pérdidas de actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica miofibrilar durante el almacenamiento en congelación. Esta disminución estaría indicando un proceso de desnaturalización o agregación de la miosina, ya que la modificación de esta propiedad refleja cambios producidos a nivel de la cabeza de la miosina, que es la parte de la molécula que contiene tanto el centro activo del enzima como el sitio de unión a la Ac (Lowey y col, 1969; Ockerman, 1977, Roura y col., 1990). La actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica es, por tanto, indicativa de la funcionalidad de la miosina en la molécula de actomiosina y es por ello que este parámetro se ha utilizado para evaluar fenómenos de desnaturalización y agregación proteica por efecto de la aplicación de diversos tratamientos térmicos (calentamiento o congelación).

Como se puede apreciar en la figura 4.39. a, todos los lotes presentaron una disminución en los niveles de actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica a lo largo del tiempo de conservación. En el lote de filetes de bacalao los valores iniciales fueron altos, produciéndose una disminución inicialmente muy pronunciada, pero que se hizo más suave a partir de la semana 8 de conservación. No se observaron diferencias significativas debidas al efecto del grado de integridad del músculo (tablas 4.22. a y b).

En los lotes de músculo picado de bacalao, merluza y bacaladilla no se observaron las dos etapas observadas en filetes de bacalao, sino que el descenso fue gradual a lo largo de todo el periodo de conservación. En músculo picado de bacalao se detectaron valores significativamente superiores a los demás lotes de músculo picado y la pérdida total de actividad tuvo lugar más tarde que en merluza o bacaladilla. Entre estas últimas no se encontraron diferencias significativas.

Los valores observados en todos los lotes se encuentran en el rango de los que encontraron otros autores para distintas especies (Tejada, 1979 en jurel; Okada y col., 1986 en carpa; Chalmers y col., 1992 en bacalao; Careche y Tejada, 1991 y 1994 en merluza y Huidobro, 1990) en bacaladilla; jurel y caballa

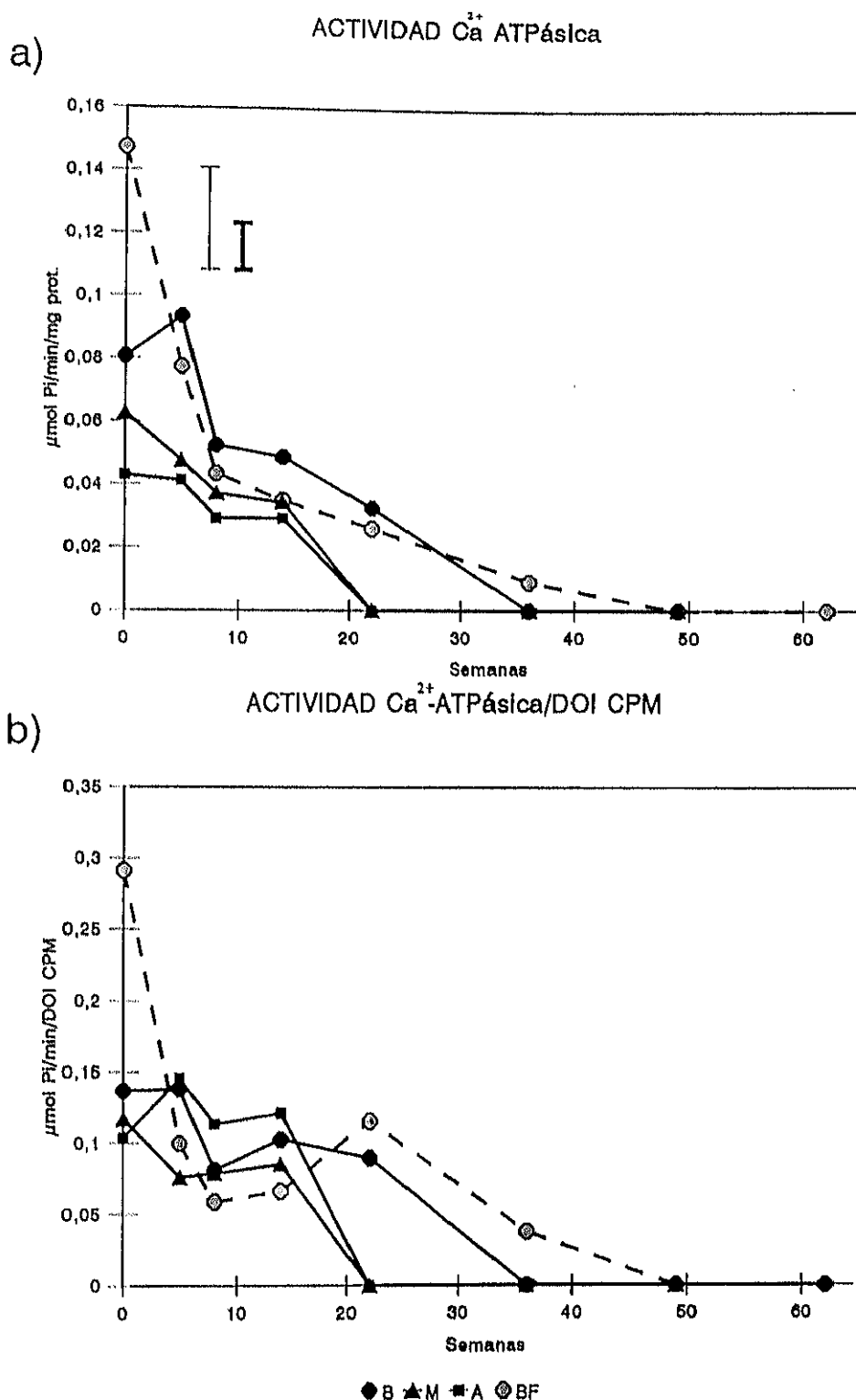


Figura 4.39.- Evolución de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$  ATPásica de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . a: expresada en  $\mu\text{mol Pi/min/mg prot.}$ ; b: expresada en  $\mu\text{mol Pi/min/DOI cadena pesada de miosina (CPM)}$ . BF: lote de filetes de bacalao; B, M y A: lotes de músculo picado de bacalao, merluza y bacaladilla respectivamente.

Las barras verticales en a indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso corresponde al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
Actividad Ca <sup>2+</sup> ATPásica	***	-	*

Tabla 4.22. a.- Análisis de la varianza correspondiente a la medida de la Actividad Ca<sup>2+</sup> ATPásica (en  $\mu$ moles de ATP/minuto/mg proteína) de la actomiosina natural (AMN) aislada en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
Actividad Ca <sup>2+</sup> ATPásica	***	***	***

Tabla 4.22 b.- Análisis de la varianza correspondiente a la medida de la Actividad Ca<sup>2+</sup> ATPásica (en  $\mu$ moles de ATP/minuto/mg proteína) de la actomiosina natural (AMN) aislada en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado de merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y la especie

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

Una cinética similar a la observada en filetes de bacalao fue observada por Tejada (1979) en músculo picado de jurel, Wagner y Añón (1986), en músculo de bovino y por Huidobro (1990), en músculo picado de bacaladilla a lo largo de la conservación en congelación. De acuerdo con Wagner y Añón (1986), el brusco descenso inicial observado fue debido a la desnaturalización de la miosina, mientras que la disminución posterior menos pronunciada se puede atribuir a una menor extractabilidad de la proteína. Estos autores expresaron la actividad de la enzima por gramo de músculo, con lo que el grado de agregación de las proteínas del músculo afectó bastante a la medida. En el presente estudio, al realizarse la medida sobre la AMN previamente aislada y expresarse por mg de AMN, no cabe la posibilidad de la influencia de los cambios en extractabilidad del músculo en la la cinética observada. Sin embargo, en el descenso en actividad ATPásica durante la conservación en congelación podrían influir también los cambios la proporción de miosina en los extractos de AMN.

Cuando la fracción S1 se estudió por electroforesis, se observó un descenso en la DOI de la CPM en S1 a lo largo del tiempo (figura 4.18.). En las tablas 4.30. a 4.33. se observa la existencia de correlación estadística significativa entre los valores de proporción de CPM (medida por DOI/g prot.) y de actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica en todos los lotes de músculo picado. Esto está de acuerdo con Roura y col. (1990), quienes encontraron una menor actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica de la merluza antes del desove, cuando la proporción de CPM (medida por la intensidad relativa de la banda correspondiente observada en las electroforesis (SDS-PAGE)) en los extractos del músculo fue mucho menor. Sin embargo en filetes no se encontró dicha correlación, por lo que en este lote estarían influyendo otros factores de manera más importante.

Al expresar la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica por DOI de la cadena pesada de la miosina (figura 4.39. b) se obtiene información acerca de la actividad enzimática de la cadena pesada de la miosina. Se observó que en filetes de bacalao hubo un descenso inicial muy intenso seguido de una estabilización y un descenso al final de la conservación. En músculo picado sólo se observó un descenso al final de la conservación, permaneciendo los valores constantes hasta entonces. Esto implica que en filetes de bacalao el descenso inicial de actividad

$\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica fue debido a la desnaturalización de la miosina. Sin embargo, la disminución observada en filetes a partir de la semana 8 de conservación, así como las detectadas en los tres lotes de músculo picado desde el inicio, fueron debidos a la disminución observada en la proporción de CPM en los extractos. Por otro lado, a pesar de que no se observó actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica en los extractos de AMN al final de la conservación, en estos se aisló cierta proporción de miosina (figura 4.18.). Esto sugiere que en el descenso observado en actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica en todos los lotes influyeron tanto la desnaturalización y/o agregación de la molécula de miosina como a la disminución en la proporción de la misma en los extractos. Por tanto, la mayor actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica detectada en músculo picado de bacalao frente a las otras dos especies se podrían atribuir a que en bacalao se extrajo más cantidad de miosina funcional y durante más tiempo que en merluza y bacaladilla.

#### 4.6.3.- GRUPOS SULFHIDRILO (-SH)

Como ya se ha indicado en el apartado 4.3.3., la agregación observada en los distintos lotes a lo largo de la conservación en congelación fue debida en parte a la formación de puentes S-S debido a la oxidación de grupos -SH.

Los cambios en el número de grupos -SH de las proteínas extraídas en la fracción S1 podrían indicarnos si la formación de dichos enlaces intra e intermoleculares tiene lugar en los estadios previos a la formación de agregados de mayor peso molecular que pasen a la fracción insoluble en NaCl 0,6 M.

En la bibliografía existen resultados contradictorios en cuanto a los cambios en grupos SH en las proteínas miofibrilares durante la conservación en congelación (apartado 1.3.1.3.).

Las variaciones en el contenido en grupos -SH a lo largo del tiempo en los distintos lotes se representan en la figura 4.40. El estudio estadístico correspondiente se muestra en la tablas 4.23. a y b. En los lotes de bacalao no se observó una tendencia sostenida a lo largo del tiempo. En los lotes de músculo picado de merluza y bacaladilla se observó un descenso

## GRUPOS SH

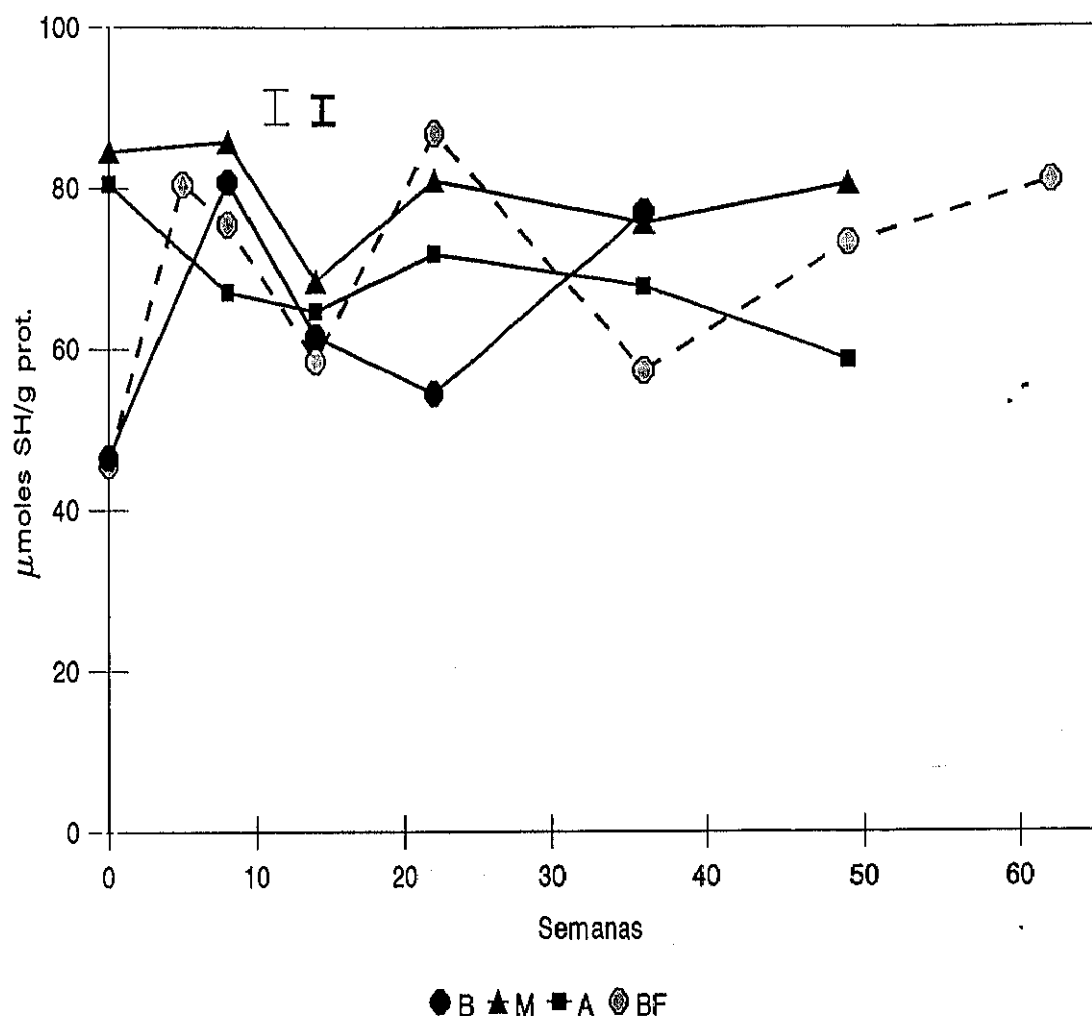


Figura 4.40.- Evolución del contenido en grupos sulfhidrilo ( $-SH$ ) ( $\mu\text{mol SH/g prot}$ ) de la actomiosina natural (AMN) extraída en  $\text{NaCl}$   $0,6 \text{ M}$  (S1) en filetes de bacalao (BF) y músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^\circ\text{C}$ .

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso corresponde al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
Grupos SH	***	***	**

Tabla 4.23 a.- Análisis de la varianza correspondiente a la medida de los grupos SH (en  $\mu$ moles de SH/g proteína) de la actomiosina natural (AMN) aislada en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
Grupos SH	***	***	***

Tabla 4.23 b.- Análisis de la varianza correspondiente a la medida de los grupos SH (en  $\mu$ moles de SH/g proteína) de la actomiosina natural (AMN) aislada en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y la especie

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

significativo, más acentuado en bacaladilla. Dicho descenso está de acuerdo con el aumento en la participación de los enlaces S-S en la agregación observada en el estudio de extractabilidad del agregado (figura 4.8.) en ambos lotes.

El que no se detectara un descenso en el número de grupos -SH en bacalao no significa que no tuviera lugar la formación de puentes disulfuro ya que, como señalaron Poulter y Lawrie (1978), durante la conservación por congelación de músculo de pescado podrían ocurrir reacciones de intercambio de puentes disulfuro intra e intermoleculares que provocarían que no se observaran cambios en el número total de grupos SH.

Se sabe que hay grupos -SH muy reactivos en la molécula de miosina que son importantes en la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica. Buttkus (1971)\* y Hamada y col. (1977) encontraron que los cambios en actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica estaban altamente relacionados con la oxidación de los grupos -SH. En el caso de los lotes de músculo picado de merluza y bacaladilla, la disminución en actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica podría relacionarse con la observada en grupos -SH. Sin embargo, los grupos -SH totales disminuyeron a menor velocidad que la actividad enzimática, por lo que no se observaron correlaciones significativas entre ambos parámetros (tablas 4.30. a 4.33. ). Esta diferencia entre los cambios detectados en grupos SH totales y actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica ha sido observada por otros autores (Jiang y col., 1989 en actomiosina de tilapia conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$  y Chen y col., 1989 en miosina aislada de hipogloso negro) y podrían indicar que no todos los grupos -SH que sufrieron reducción durante la conservación estaban relacionados con la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica.

#### 4.6.4.- HIDROFOBICIDAD SUPERFICIAL

Diferentes autores han encontrado un incremento de la hidrofobicidad superficial de proteínas miofibrilares *in situ* o en sistema modelo de proteína aislada, como consecuencia de la congelación y conservación en estado congelado (Niwa y col, 1986 a y b; Owusu-Ansah y Hultin, 1987; Ang y Hultin, 1989; LeBlanc y LeBlanc, 1992). Este aumento se ha relacionado con un incremento de la exposición de grupos hidrofóbicos de la proteína debido



## HIDROFOBICIDAD SUPERFICIAL ALIFATICA (CPA)

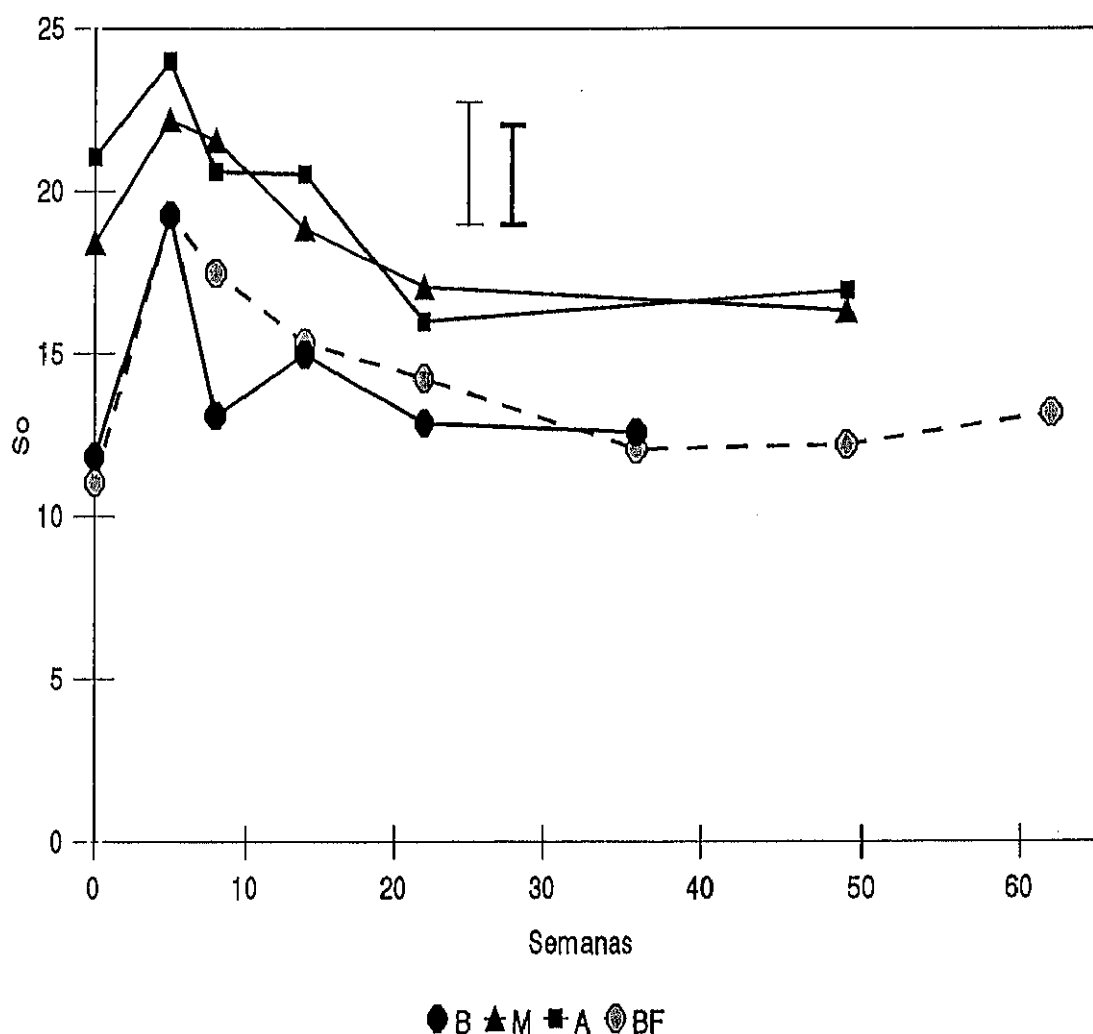


Figura 4.41.- Evolución en la hidrofobicidad superficial alifática (CPA) ( $S_o$ , unidades arbitrarias) de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1) de filetes de bacalao (BF) y de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso corresponde al estudio en función de la especie (lotes B, M y A)).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
Hidrofobicidad CPA	***	-	-

Tabla 4.24 a.- Análisis de la varianza correspondiente a las distintas medida de la hidrofobicidad superficial alifática (CPA, en unidades arbitrarias) de la actomiosina natural (AMN) aislada en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
Hidrofobicidad CPA	***	***	-

Tabla 4.24 b.- Análisis de la varianza correspondiente a la medida de la hidrofobicidad superficial alifática (CPA, en unidades arbitrarias) de la actomiosina aislada natural (AMN) en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado de (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y la especie

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

a la ruptura de ciertas interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno y de la modificación química de algunos restos de aminoácidos. La nueva orientación de los grupos hidrofóbicos de los aminoácidos (modificados, no modificados o ambos) hace que los grupos no polares afloren a la superficie y que los grupos polares se internen dentro de la estructura (Niwa y col, 1986 a y b; Ang y Hultin, 1989).

Las figuras 4.41. y 4.42. muestran los cambios producidos en la hidrofobicidad superficial alifática (CPA) y aromática (ANS) respectivamente de la AMN extraída de los distintos lotes. Las tablas 4.24. (a y b) y 4.25. (a y b) muestran los resultados del análisis estadístico de las medidas de hidrofobicidad superficial CPA y ANS respectivamente.

La medida de la hidrofobicidad superficial debida a grupos alifáticos se realizó utilizando el reactivo de fluorescencia CPA. La figura 4.41. muestra los resultados de dichas medidas. En ella se observa que tuvo lugar un incremento de la exposición de grupos alifáticos en las 5 primeras semanas de conservación en todos los lotes. En músculo picado de bacalao se observó un descenso, alcanzándose valores similares a los iniciales al final del estudio. Los valores obtenidos al inicio y final del estudio están en el rango de los observados por LeBlanc y LeBlanc (1992) en filetes de bacalao conservados en congelación durante un periodo igual y a similar temperatura. Sin embargo, dichos autores no realizaron determinaciones a lo largo del tiempo, por lo que no detectaron los cambios intermedios observados en este estudio.

La hidrofobicidad superficial alifática (CPA) de la AMN fue superior en músculo picado de merluza y bacaladilla que en bacalao. En merluza y bacaladilla se observó un incremento inicial seguido de un descenso hasta el final de la conservación. Sin embargo, en bacaladilla, el aumento inicial no fue significativo. Los valores observados en merluza se encontraron en el rango de los indicados por Cofrades (1994).

La determinación de la hidrofobicidad superficial debida a grupos aromáticos se realizó utilizando el reactivo de fluorescencia ANS. Los resultados se muestran en la figura 4.41. En esta se observó un incremento en las etapas iniciales de la conservación en todos los lotes. En

## HIDROFOBICIDAD SUPERFICIAL AROMATICA (ANS)

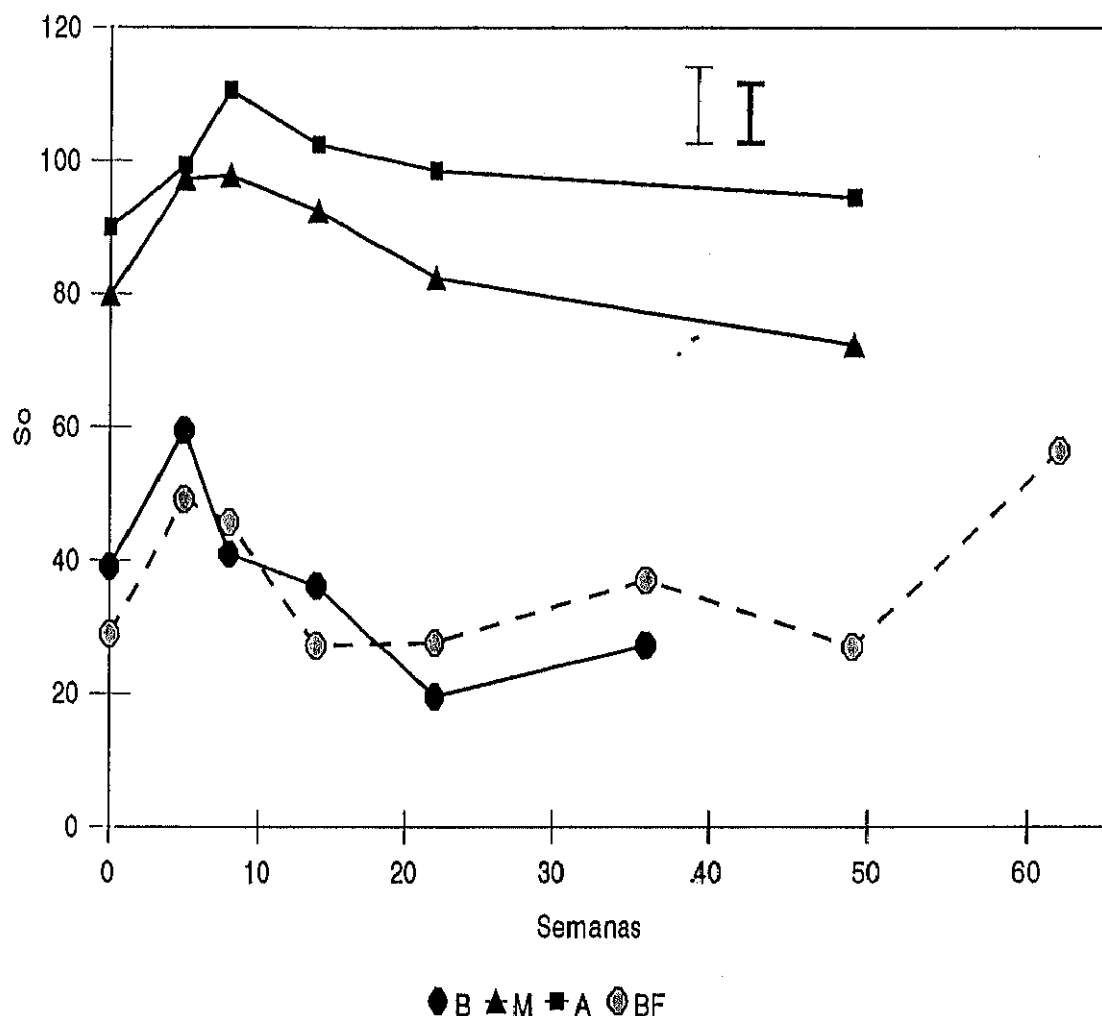


Figura 4.42.- Evolución en la hidrofobicidad superficial aromática (ANS) ( $S_0$  unidades arbitrarias) de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1) de filetes de bacalao (BF), músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF) y la de trazo grueso corresponde al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
ANS	***	-	*

Tabla 4.25 a.- Análisis de la varianza correspondiente a la medida de la hidrofobicidad superficial aromática (ANS, en unidades arbitrarias) de la actomiosina natural (AMN) aislada en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
ANS	***	***	***

Tabla 4.25 b.- Análisis de la varianza correspondiente a la medida de la hidrofobicidad superficial aromática (ANS, en unidades arbitrarias) de la actomiosina natural (AMN) aislada en NaCl 0,6 M (S1) de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x GIM = Interacción entre el efecto del tiempo y el grado de integridad del músculo.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y la especie

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

músculo picado y filetes de bacalao se detectó un descenso posterior. En filetes hubo un aumento al final de la conservación.

En los lotes de merluza y bacaladilla los valores de hidrofobicidad superficial aromática (ANS) fueron significativamente superiores a los observados en músculo picado de bacalao. En merluza, al igual que en bacalao, se observó un incremento significativo al inicio de la conservación seguido de una disminución gradual hasta el final del periodo de conservación. En bacaladilla se observó un incremento inicial sin que se detectaran posteriormente cambios significativos. Los valores de hidrofobicidad superficial ANS medidos en la AMN de merluza fueron similares a los observados por Cofrades (1994) en la misma especie.

El aumento en hidrofobicidad, tanto aromática como alifática, observado durante las primeras semanas de conservación en todos los lotes puede entenderse por la desnaturalización que tiene lugar como consecuencia de la conservación en congelación, que, como ya se ha indicado, produce un incremento de la exposición de grupos hidrofóbicos de la proteína. El descenso y/o estabilización observados posteriormente podrían explicarse por un posible aumento en el tamaño de los agregados solubles detectados en la AMN a lo largo de la conservación. Este aumento se observó en músculo picado de bacalao por microscopía electrónica y cromatografía de gel filtración (apartados 4.5. y 4.6.1.), no descartándose la posibilidad de que tuviera lugar también en los otros lotes. Estos agregados disminuirían la superficie específica de unión del reactivo de fluorescencia provocando así una estabilización e incluso un descenso en la de emisión fluorescente por gramo de proteína. Esta hipótesis fue también postulada por Cofrades (1994) para explicar el descenso observado en los valores de hidrofobicidad, tanto aromática como alifática, de AMN de merluza conservada en congelación. Dicha autora observó un descenso tanto en las etapas finales de la conservación como en etapas tempranas en presencia de FA, es decir, siempre que existía mayor agregación de la proteína en la muestra.

#### 4.6.5.- VISCOSIDAD APARENTE ( $\eta_{ap}$ )

Como ya se indicó en el apartado 4.2.1., la viscosidad de las soluciones proteicas es una propiedad funcional cuya medida es utilizada frecuentemente como método para determinar el grado de desnaturalización y agregación de las proteínas. En dicho apartado se describieron los principales factores que afectan al comportamiento viscoso de una solución o dispersión proteica. Entre ellos, la concentración de proteína es uno de los factores más estrechamente relacionados con los valores de  $\eta_{ap}$  (Rha y Pradipasena, 1986; Cofrades y col., 1993). En disoluciones diluidas la  $\eta_{ap}$  depende de la forma y tamaño de las moléculas, pues predomina la interacción entre estas y las del solvente (Chen y col., 1988). Dependiendo del tipo de proteína, cuando su concentración es grande, predomina la interacción proteína-proteína (Hamm, 1975; Kinsella, 1976; Rha y Pradipasena, 1986).

En la técnica de  $\eta_{ap}$  de de músculo, discutidas en el apartado 4.2.1., la medida se realiza sobre los homogeneizados de músculo previamente filtrados (apartado 3.2.2.1.). Cuando la actomiosina está muy agregada, parte de esta podría quedar retenida en este paso, con lo que la concentración del filtrado sobre el que se realiza la medida sería menor cuanto mayor sea la agregación. Esta, como se ha indicado en los apartados 4.2.1. y 4.3.1. aumenta a lo largo de la conservación. Las proteínas miofibrilares son, entre las proteínas del músculo, las mayores responsables del comportamiento viscoso (Borderías y col., 1985 a, Huidobro y Tejada, 1993 b) y, entre estas, la actomiosina es la de mayor viscosidad intrínseca (Crupkin y col., 1982). Por eso, la medida de  $\eta_{ap}$  en los extractos de AMN a concentración constante podría dar una información más específica en relación con la desnaturalización de la AMN durante la conservación en congelación.

En la figura 4.43. se representan los cambios observados en las medidas de  $\eta_{ap}$  realizadas en soluciones de actomiosina de concentración 5 mg/mL en NaCl 0,6 M y 0°C. En la tabla 4.26. se muestran los resultados del análisis de varianza en función del tiempo y la especie.

En la figura 4.45. se observan los valores de  $\eta_{ap}$  en soluciones de 5 mg/ml de

# VISCOSIDAD APARENTE ( $\eta_{ap}$ (a), 5 mg/mL, 0°C)

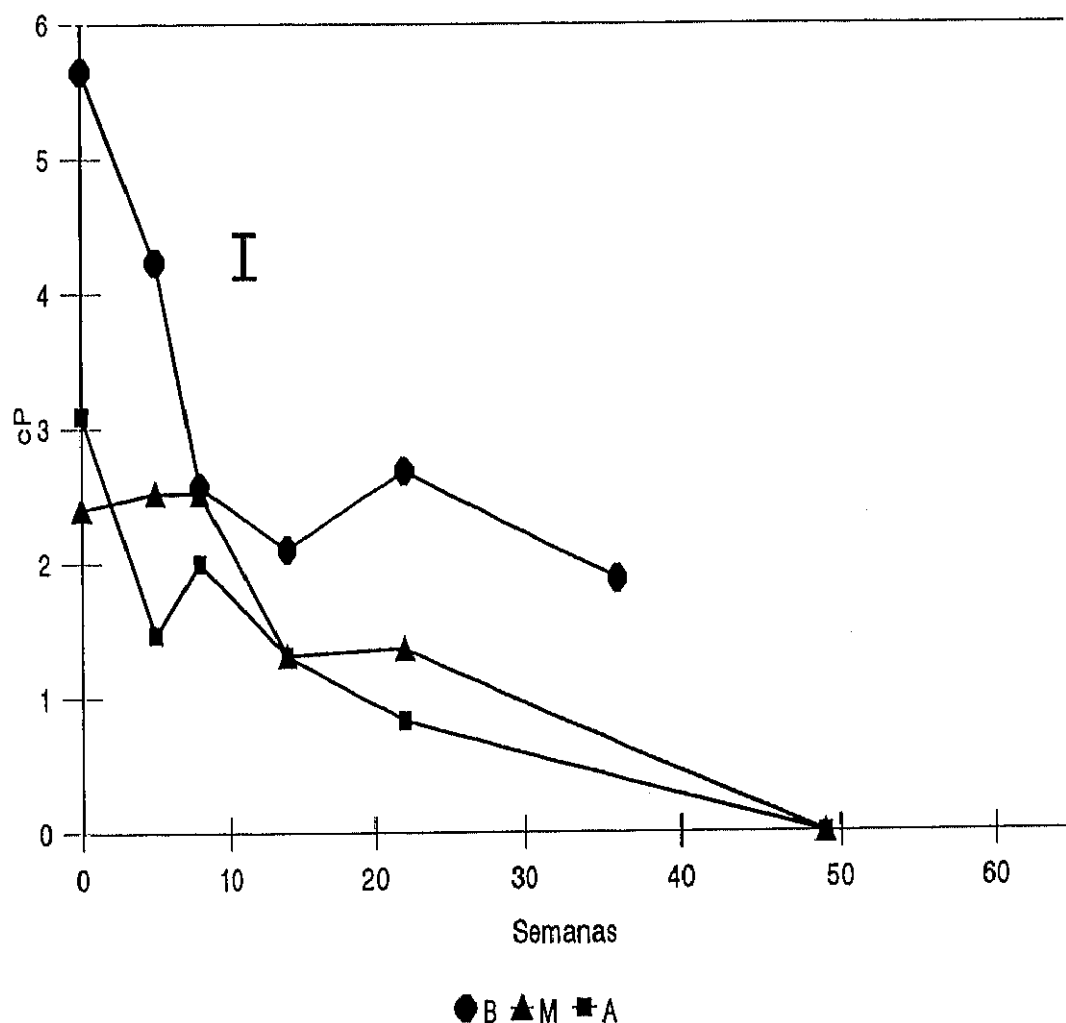


Figura 4.43.- Evolución de la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) (cP) de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1) en músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La medida se realizó sobre una solución de la AMN en NaCl 0,6 M y pH 7, a concentración de 5 mg/ml y  $0^{\circ}\text{C}$ .

La barra vertical indica el intervalo de confianza al 95% correspondiente al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).



	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
$\eta_{ap}a$	***	***	***

Tabla 4.26.- Análisis de la varianza correspondiente a la medida de la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}a$ , 5mg/ml, 0°C, en cP) de la actomiosina natural (AMN) aislada en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y la especie

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

— = Efecto no significativo

concentración de actomiosina en NaCl 0,3 M + SDS 2% a 25°C. El análisis estadístico correspondiente se recoge en la tabla 4.28. El SDS es un detergente que rompe las uniones secundarias (Owusu-Ansah y Hultin, 1987; Roussel y Cheftel, 1990). El objeto de medir la  $\eta_{sp}$  en presencia de SDS fue observar la influencia de este tipo de enlaces en las características reológicas de las disoluciones de la AMN. Como el SDS es insoluble a temperaturas bajas, la medida se realizó a 25°C. Debido a la influencia de la temperatura en la  $\eta_{sp}$ , para observar el efecto del SDS se utilizó como blanco el valor de la  $\eta_{sp}$  de la disolución proteica en NaCl 0,6 M a la misma concentración y a 25°C (figura 4.44. y análisis estadístico en tabla 4.27.).

En todas las figuras se representan solamente los valores correspondientes a la AMN extraída de los lotes de músculo picado debido a que la gran variabilidad de las medidas observadas en la AMN de filetes de bacalao, no nos permitió obtener información útil.

#### $\eta_{sp}$ de las soluciones de AMN en NaCl 0,6 M (5mg/mL)

En la figura 4.43. se observan diferencias significativas entre los valores de músculo picado de bacalao y de las otras dos especies, siendo estos últimos similares e inferiores a los encontrados en bacalao. En este último tuvo lugar un descenso acusado en las 8 primeras semanas de conservación, manteniéndose estable a continuación. Sin embargo, en merluza y bacaladilla el descenso fue más gradual.

Las diferencias entre el lote de músculo picado de bacalao y los de merluza y bacaladilla se observaron también en  $\eta_{sp}$  de músculo (figura 4.2.) hasta la semana 14 de conservación. Sin embargo, en las etapas finales de la conservación, tuvo lugar un descenso muy acusado de la  $\eta_{sp}$  de músculo en el lote de músculo picado de bacalao. Las medidas de  $\eta_{sp}$  de AMN aislada sugieren que los menores valores de  $\eta_{sp}$  de músculo picado de bacalao observados en las etapas finales de la conservación pudieran atribuirse a un aumento de la agregación de la proteína miofibrilar.

Los cambios observados a 25°C (figura 4.44.) fueron similares a los detectados a 0°C

VISCOSIDAD APARENTE  
( $\eta_{ap}$  (SDS), 5mg/mL, 2% SDS + 0,3M NaCl, 25°C)

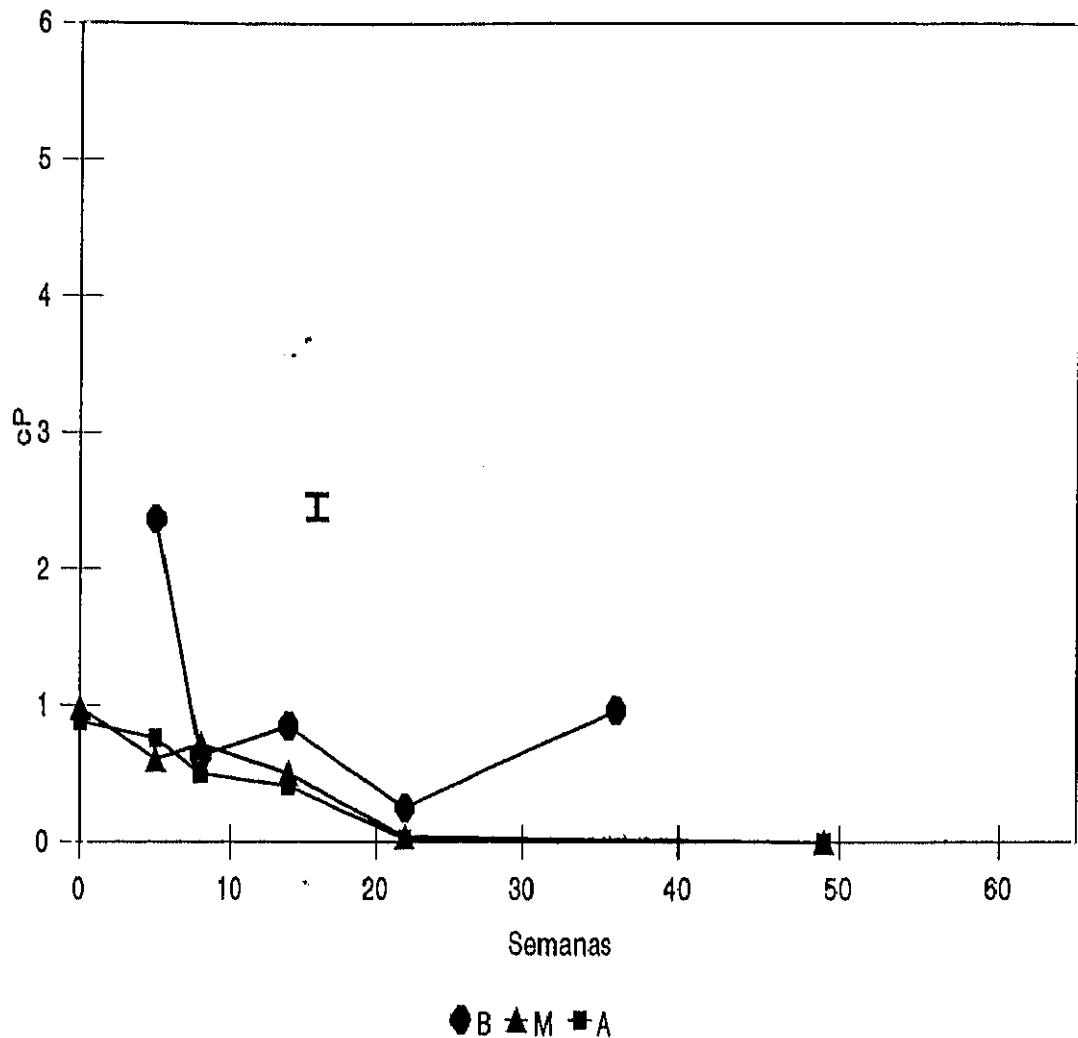


Figura 4.45.- Evolución de la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) (cP) de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1) en músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La medida se realizó sobre una solución de la AMN en SDS 2%, NaCl 0,3 M y pH 7, a concentración de 5 mg/ml y  $25^{\circ}\text{C}$ .

La barra vertical indica el intervalo de confianza al 95% correspondiente al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
$\eta_{ap}$ SDS	***	***	***

Tabla 4.28.- Análisis de la varianza correspondiente a la medida de la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$  SDS, 5mg/ml, 25°C, en cP) de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) y posteriormente disuelta en solución de SDS 2% + NaCl 0,3 M, en función de la especie y conservación en estado congelado

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y la especie

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

# VISCOSIDAD APARENTE ( $\eta_{ap}$ (b), 5mg/ml, 25°C)

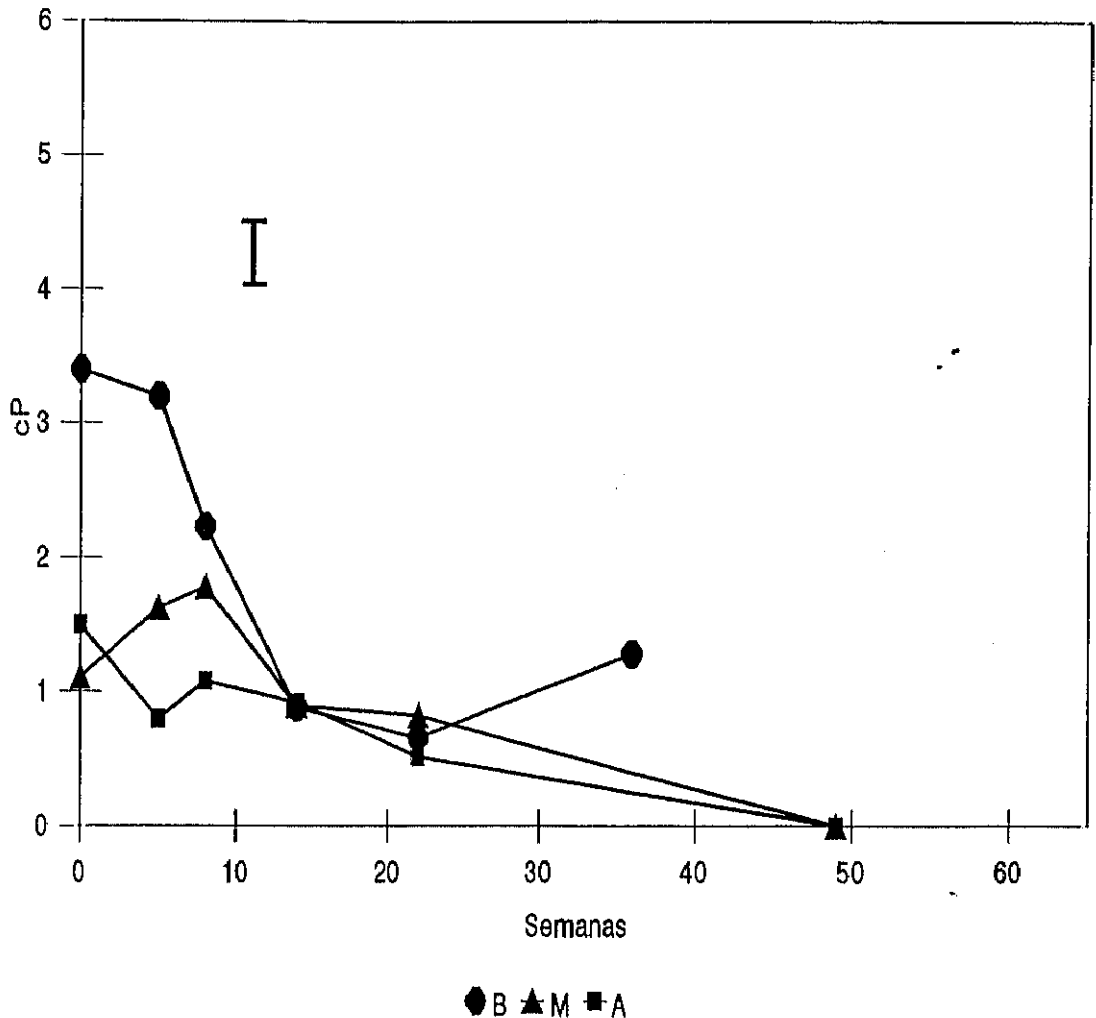


Figura 4.44.- Evolución de la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) (cP) de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1) en músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La medida se realizó sobre una solución de la AMN en 0,6 M NaCl y pH 7, a concentración de 5 mg/ml y  $25^{\circ}\text{C}$ .

La barra vertical indica el intervalo de confianza al 95% correspondiente al estudio en función de la especie (lotes B, M y A).

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
$\eta_{ap}b$	***	***	***

Tabla 4.27.- Análisis de la varianza correspondiente a la medida de la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}b$ , 5mg/ml, 25°C, en cP) de la actomiosina natural (AMN) aislada en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en función de la especie y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y la especie

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

– = Efecto no significativo

(figura 4.43.), aunque la mayor temperatura dio lugar a un descenso ligero de los valores debido probablemente a la ruptura de puentes de hidrógeno, como sugieren Rha y Pradipasena (1986).

#### $\eta_{ap}$ de las soluciones de AMN en SDS 2% y NaCl 0,3 M (5mg/ml)

En la figura 4.45. se observa que, en los tres lotes, la presencia de SDS producía una disminución de la  $\eta_{ap}$  respecto del blanco (figura 4.44.), aunque no afectó a la tendencia observada a lo largo del tiempo.

La medida de  $\eta_{ap}$  refleja cambios en la conformación de la molécula, al afectar esta a su relación axial (Kinsella, 1976; Cupkin, 1983). Así, esta ha sido utilizada para determinar el grado de desnaturalización durante la conservación por congelación (Matsumoto, 1980; Jiménez Colmenero y Borderías, 1983; Jiménez Colmenero y col., 1988). La disminución en la  $\eta_{ap}$  observada a lo largo de la conservación puede atribuirse, por tanto, a la existencia de cambios conformacionales en las moléculas en solución. Matsumoto (1980) sugiere que la disminución en la  $\eta_{ap}$  podría ser debida a que la NAM pierde su estructura filamentosa, bien por que las moléculas individuales se repliegan sobre sí mismas o bien por agregación de los filamentos, todo lo cual disminuye la relación axial de las moléculas. La relación entre la presencia de agregados en las soluciones proteicas y el descenso en  $\eta_{ap}$  detectados a lo largo de la conservación fue postulada por algunos autores (Jiménez Colmenero y Borderías, 1983; Huidobro y Tejada, 1993 b; Cofrades, 1994). El aumento en el tamaño de los agregados al aumentar el tiempo de conservación podría explicar el descenso en  $\eta_{ap}$  de los extractos de AMN. Por microscopía electrónica (apartado 4.5.) se observó un aumento en el tamaño de los agregados al aumentar el tiempo de conservación en músculo picado de bacalao. El tratamiento con SDS, rompiendo interacciones secundarias inter e intraproteicas, produjo un descenso de la  $\eta_{ap}$ , ya que dichas interacciones contribuyen a aumentar la relación axial de las partículas en la disolución y con ello las medidas de  $\eta_{ap}$ . Sin embargo, la adición del detergente no alteró la tendencia observada, por lo que se podría inferir que existen otros factores, aparte de la agregación por interacciones secundarias, que podrían influir en estos

cambios. Por electroforesis no se observó un aumento de los agregados de naturaleza covalente no S-S, pero la agregación por interacciones S-S de la AMN extraída podría haber aumentado. Estos enlaces no se rompen con SDS, por lo que el tratamiento con este detergente no alteraría la tendencia al descenso observada en  $\eta_{ap}$  si los enlaces S-S hubieran intervenido en la formación agregados de AMN y en su crecimiento. En merluza y bacaladilla, los cambios observados en grupos S-S (apartado 4.6.4.) estarían de acuerdo con esto.

Por otro lado, la composición de los extractos de AMN podría influir también en los valores de  $\eta_{ap}$  de los mismos (Hamm, 1975; Crupkin y col., 1982, Cofrades, 1994). Los cambios en proporción de CPM, al ser la proteína mayoritaria en los extractos, podrían afectar a los valores de  $\eta_{ap}$ . La miosina es más viscosa que otras proteínas como la Ac, TMs o TNs (Cofrades, 1994). En las tablas 4.30. a 4.33. se observa como, en los lotes de músculo picado hubo correlación estadística significativa entre los valores de  $\eta_{ap}$  a 0°C y la proporción de miosina (DOI/g prot. de CPM).

En general, los valores de  $\eta_{ap}$  de AMN aislada podrían explicar lo observado en  $\eta_{ap}$  de músculo y además corroboran la mayor funcionalidad de la AMN del lote de músculo picado de bacalao frente a los de merluza y bacaladilla desde el inicio y a lo largo de la conservación, algo que se había observado también a través de la medida de proporción de miosina (figura 4.18.) y actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica de dichos extractos (figura 4.39.).

#### 4.6.6.- INDICE DE ACTIVIDAD DE EMULSION (IAE)

La capacidad de emulsión de la soluciones proteicas es una propiedad funcional relacionada con las características de superficie de las moléculas. Esta mide la capacidad de las moléculas proteicas de disminuir las tension superficial que existe entre una fase hidrofílica y otra hidrofóbica. Dentro de las proteínas del músculo, la miosina y la actomiosina son las que resultan más eficaces como depresoras de la tensión superficial (Morrissey y col., 1987), y por tanto las de mayor capacidad de emulsificar grasas. La capacidad de emulsión de las soluciones proteicas está influida a su vez por la concentración y solubilidad de las mismas



# INDICE DE ACTIVIDAD DE EMULSION (IAE)

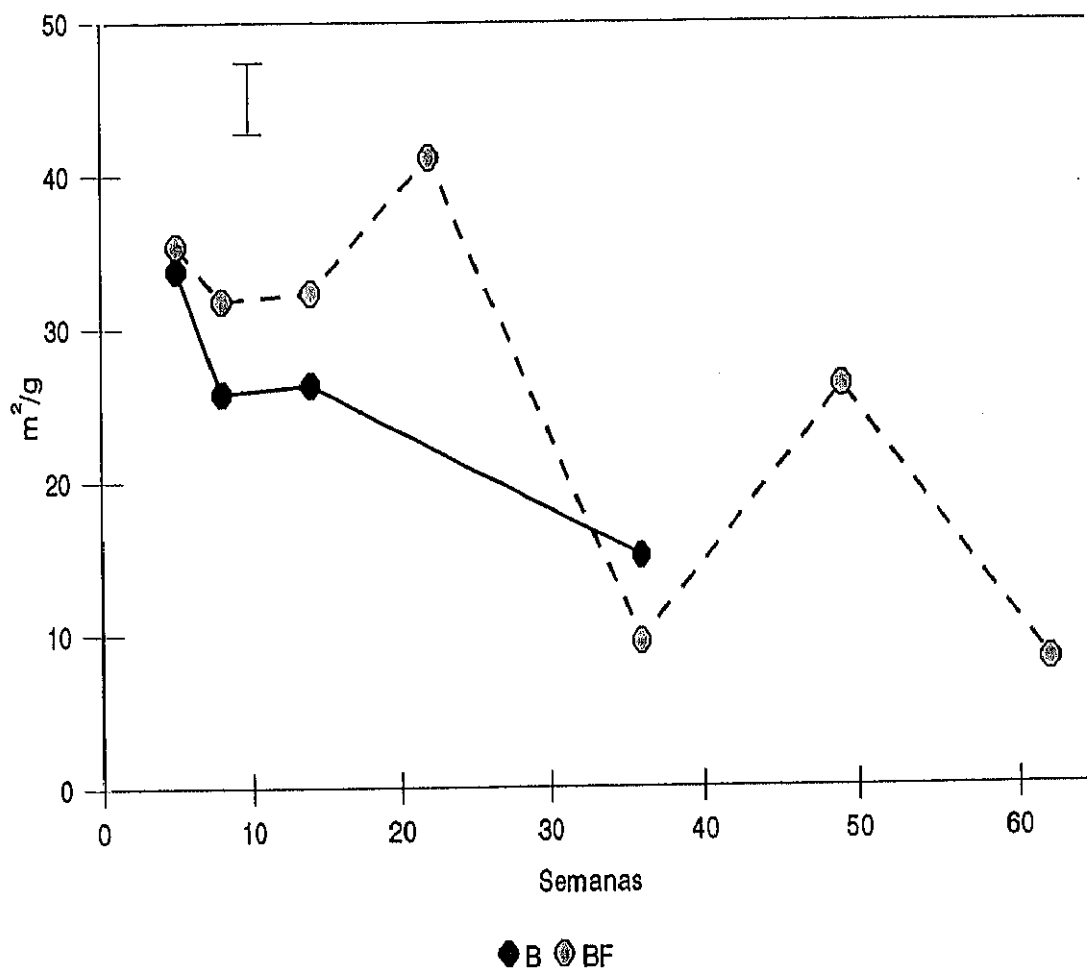


Figura 4.46.- Evolución en el índice de actividad de emulsión (IAE) ( $m^2/g$  prot.) de la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1) en los lotes de filetes (BF) y músculo picado de bacalao (B) durante la conservación en congelación a  $-20^{\circ}C$ .

La barra vertical indica el intervalo de confianza al 95%, correspondiente al estudio en función del grado de integridad del músculo (lotes B y BF).

	TIEMPO	GIM	TIEMPO x GIM
IAE	***	-	*

Tabla 4.29.- Análisis de la varianza correspondiente a la medida del índice de estabilidad de emulsión (IAE) (en  $\text{m}^2/\text{g}$  AMN) de la actomiosina natural (AMN) aislada en NaCl 0,6 M (S1) de músculo picado y filetes de bacalao (B y BF respectivamente) en función del grado de integridad del músculo (GIM) y del tiempo de conservación en estado congelado

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y la especie

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

y por el pH, fuerza iónica y temperatura del medio (Cheftel y col., 1989).

La determinación de las propiedades de emulsión de la AMN extraída se realizó mediante la medida del IAE. Este método requiere menor cantidad de proteína que la técnica empleada más ampliamente hasta ahora, basada en el modelo propuesto por Swift y col. (1961) (Jiménez Colmenero y Borderías, 1983; Tejada y col., 1987; Huidobro y Tejada, 1993 a).

La figura 4.46. muestra los cambios en IAE detectados en ambos lotes de bacalao. Los resultados del estudio estadístico se muestran en la tabla 4.29. Se observó una disminución evidente en la semana 36, tanto en filetes como en músculo picado. Los valores obtenidos fueron ligeramente interiores a los detectados por Cofrades (1994) en AMN aislada de merluza. Huidobro y Tejada (1993 a) en bacaladilla, y caballa y Careche y Tejada (1988) en merluza, observaron también un descenso en la capacidad de emulsión (g de aceite/g de músculo) a lo largo de la conservación en congelación y lo atribuyeron a la desnaturalización y agregación de las proteínas del músculo producida durante el almacenamiento en congelación. Los agregados proteicos contribuyen muy poco a la capacidad de emulsión (Cheftel y col., 1987), por lo que la mayor presencia de estos en las soluciones provoca una disminución de dicha propiedad.

En el presente estudio, la medida se realizó sobre la fracción de AMN soluble, por lo que los cambios en extractabilidad de proteínas en sal no afectan a esta, como lo hace en el caso de los trabajos citados anteriormente, donde la medida se realiza sobre homogeneizados de músculo. Sin embargo, como ya se ha indicado, también en los extractos de AMN existió cierta agregación que aumentó a lo largo del periodo de conservación. Esto podría ser la causa de la disminución de los valores de IAE encontrados. Se observaron diferencias significativas entre músculo picado y filetes, aunque solamente en algunos controles al inicio de la conservación, con lo cual no se dispuso de datos suficientes para sacar una conclusión respecto al efecto del grado de integridad del músculo.

Li-Chan y col. (1984) han indicado que cuando la solubilidad proteica es grande (más del 50%) el efecto de la hidrofobicidad superficial en la capacidad de emulsión es muy

	ATPasa	$\eta_{ap}5a$	$\eta_{ap}5b$	$\eta_{ap}5SDS$	SH
ATPasa	1				
$\eta_{ap}5a$	**	1			
$\eta_{ap}5b$	**	***	1		
$\eta_{ap}5SDS$	**	***	***	1	
SH	—	—	—	—	1
CPA	—	—	—	—	*
ANS	*	—	**	*	—
CPM	***	*	**	*	—
Ac	—	—	—	—	—
CPM/Ac	**	***	**	*	—
IAE	*	*	—	—	—

Tabla 4.30. a – Músculo picado de bacalao (B) ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1). ATPasa: Actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica;  $\eta_{ap}5a$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,6 M a  $0^{\circ}\text{C}$ ;  $\eta_{ap}5b$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M a  $25^{\circ}\text{C}$ ;  $\eta_{ap}5SDS$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M + SDS 2% a  $25^{\circ}\text{C}$ ; SH: grupos sulfhidrilo; CPA: hidrofobicidad superficial CPA; ANS: hidrofobicidad superficial ANS; CPM: DOI de CPM; Ac: DOI de Ac; CPM/Ac: DOI de CPM/ DOI de Ac; IAE: índice de actividad de emulsión.

Nivel de significación de la correlación: \*\*\* = significativa a  $p < 0.001$ ; \*\* = significativa a  $p < 0.01$ ; \* = significativa a  $p < 0.05$ ; — = no significativa

	CPA	ANS	CPM	Ac	CPM/Ac	IAE
CPA	1					
ANS	-	1				
CPM	-	**	1			
Ac	-	-	-	1		
CPM/Ac	-	-	*	-	1	
IAE	-	-	-	-	*	1

Tabla 4.30. b - Músculo picado de bacalao (B) (-20°C). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1). ATPasa: Actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica;  $\eta_{ap}5a$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,6 M a 0°C;  $\eta_{ap}5b$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M a 25°C;  $\eta_{ap}5\text{SDS}$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M + SDS 2% a 25°C; CPA: hidrofobicidad superficial CPA; ANS: hidrofobicidad superficial ANS; CPM: DOI de CPM; Ac: DOI de Ac; CPM/Ac: DOI de CPM/ DOI de Ac; IAE: índice de actividad de emulsión.

Nivel de significación de la correlación: \*\*\* = significativa a  $p < 0.001$ ; \*\* = significativa a  $p < 0.01$ ; \* = significativa a  $p < 0.05$ ; - = no significativa

(a)

	ATPasa	SH	CPA	ANS
ATPasa	1			
SH	-	1		
CPA	-	*	1	
ANS	-	-	*	1
CPM	-	-	**	**
Ac	-	-	**	*
CPM/Ac	-	-	-	-
IAE	-	-	-	-

(b)

	CPM	Ac	CPM/Ac	EAI
CPM	1			
Ac	*	1		
CPM/Ac	***	-	1	
IAE	-	-	-	1

Tabla 4.31. a y b.- Filetes de bacalao (BF) (-20°C). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1). ATPasa: Actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica; SH: grupos sulfhidrilo; CPA: hidrofobicidad superficial CPA; ANS: hidrofobicidad superficial ANS; CPM: DOI de CPM; Ac: DOI de Ac; CPM/Ac: DOI de CPM/DOI de Ac; IAE: índice de actividad de emulsión.

Nivel de significación de la correlación: \*\*\* = significativa a  $p < 0.001$ ; \*\* = significativa a  $p < 0.01$ ; \* = significativa a  $p < 0.05$ ; - = no significativa

	ATPasa	$\eta_{ap}5a$	$\eta_{ap}5b$	$\eta_{ap}SDS$	SH
ATPasa	1				
$\eta_{ap}5a$	***	1			
$\eta_{ap}5b$	**	***	1		
$\eta_{ap}SDS$	***	***	**	1	
SH	–	–	–	–	1
CPA	–	***	***	–	–
ANS	–	*	**	–	–
CPM	*	**	*	–	–
Ac	***	**	**	***	–
CPM/Ac	–	–	–	–	–

Tabla 4.32. a – Musculo picado de merluza (M) ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1). ATPasa: Actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica;  $\eta_{ap}5a$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,6 M a  $0^{\circ}\text{C}$ ;  $\eta_{ap}5b$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M a  $25^{\circ}\text{C}$ ;  $\eta_{ap}SDS$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M + SDS 2% a  $25^{\circ}\text{C}$ ; SH: grupos sulfhidrilo; CPA: hidrofobicidad superficial CPA; ANS: hidrofobicidad superficial ANS; CPM: DOI de CPM; Ac: DOI de Ac; CPM/Ac: DOI de CPM/ DOI de Ac.

Nivel de significación de la correlación: \*\*\* = significativa a  $p < 0.001$ ; \*\* = significativa a  $p < 0.01$ ; \* = significativa a  $p < 0.05$ ; – = no significativa

	ATPasa	$\eta_{ap}5a$	$\eta_{ap}5b$	$\eta_{ap}SDS$	SH
ATPasa	1				
$\eta_{ap}5a$	***	1			
$\eta_{ap}5b$	**	***	1		
$\eta_{ap}SDS$	***	***	**	1	
SH	—	—	—	—	1
CPA	—	***	***	—	—
ANS	—	*	**	—	—
CPM	*	**	*	—	—
Ac	***	**	**	***	—
CPM/Ac	—	—	—	—	—

Tabla 4.32. a – Musculo picado de merluza (M) ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1). ATPasa: Actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica;  $\eta_{ap}5a$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,6 M a  $0^{\circ}\text{C}$ ;  $\eta_{ap}5b$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M a  $25^{\circ}\text{C}$ ;  $\eta_{ap}SDS$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M + SDS 2% a  $25^{\circ}\text{C}$ ; SH: grupos sulfhidrilo; CPA: hidrofobicidad superficial CPA; ANS: hidrofobicidad superficial ANS; CPM: DOI de CPM; Ac: DOI de Ac; CPM/Ac: DOI de CPM/ DOI de Ac.

Nivel de significación de la correlación: \*\*\* = significativa a  $p < 0.001$ ; \*\* = significativa a  $p < 0.01$ ; \* = significativa a  $p < 0.05$ ; — = no significativa



	CPA	ANS	CPM	Ac	CPM/Ac
CPA	1				
ANS	***	1			
CPM	*	–	1		
Ac	**	*	*	1	
CPM/Ac	–	–	–	–	1

Tabla 4.32. b – Músculo picado de merluza (M) (–20°C). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1). ATPasa: Actividad  $\text{Ca}^{2+}$ –ATPásica;  $\eta_{ap}5a$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,6 M a 0°C;  $\eta_{ap}5b$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M a 25°C;  $\eta_{ap}5SDS$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M + SDS 2% a 25°C; CPA: hidrofobicidad superficial CPA; ANS: hidrofobicidad superficial ANS; CPM: DOI de CPM; Ac: DOI de Ac; CPM/Ac: DOI de CPM/ DOI de Ac.

Nivel de significación de la correlación: \*\*\* = significativa a  $p < 0.001$ ; \*\* = significativa a  $p < 0.01$ ; \* = significativa a  $p < 0.05$ ; – = no significativa

	ATPasa	$\eta_{ap}5a$	$\eta_{ap}5b$	$\eta_{ap}SDS$	SH
ATPasa	1				
$\eta_{ap}5a$	***	1			
$\eta_{ap}5b$	***	***	1		
$\eta_{ap}SDS$	***	***	***	1	
SH	*	**	**	*	1
CPA	**	*	*	**	—
ANS	—	—	—	—	—
CPM	**	***	***	**	***
Ac	—	**	*	—	—
CPM/Ac	***	***	***	***	***

Tabla 4.33. a – Músculo picado de bacaladilla (A) ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1). ATPasa: Actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica;  $\eta_{ap}5a$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,6 M a  $0^{\circ}\text{C}$ ;  $\eta_{ap}5b$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M a  $25^{\circ}\text{C}$ ;  $\eta_{ap}5SDS$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M + SDS 2% a  $25^{\circ}\text{C}$ ; SH: grupos sulfhidrilo; CPA: hidrofobicidad superficial CPA; ANS: hidrofobicidad superficial ANS; CPM: DOI de CPM; Ac: DOI de Ac; CPM/Ac: DOI de CPM/ DOI de Ac.

Nivel de significación de la correlación: \*\*\* = significativa a  $p < 0.001$ ; \*\* = significativa a  $p < 0.01$ ; \* = significativa a  $p < 0.05$ ; — = no significativa

	CPA	ANS	CPM	Ac	CPM/Ac
CPA	1				
ANS	-	1			
CPM	*	-	1		
Ac	-	-	**	1	
CPM/Ac	**	-	***	-	1

Tabla 4.33. b - Músculo picado de bacaladilla (A) (-20°C). Correlaciones entre los distintos análisis realizados sobre la actomiosina natural (AMN) extraída en NaCl 0,6 M (S1). ATPasa: Actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica;  $\eta_{ap}5a$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,6 M a 0°C;  $\eta_{ap}5b$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M a 25°C;  $\eta_{ap}5\text{SDS}$ : viscosidad aparente a concentración de AMN de 5 mg/ml en NaCl 0,3 M + SDS 2% a 25°C; CPA: hidrofobicidad superficial CPA; ANS: hidrofobicidad superficial ANS; CPM: DOI de CPM; Ac: DOI de Ac; CPM/Ac: DOI de CPM/ DOI de Ac.

Nivel de significación de la correlación: \*\*\* = significativa a  $p < 0.001$ ; \*\* = significativa a  $p < 0.01$ ; \* = significativa a  $p < 0.05$ ; - = no significativa

importante, pero a baja solubilidad, la presencia de agregados es el factor determinante. Esto lo pudo comprobar Cofrades (1994), que observó un aumento en el IAE en sistema modelo aislada de AMN de merluza durante la conservación en congelación, debido al aumento en hidrofobicidad superficial, sin embargo, en presencia de FA observó un marcado descenso, debido a la presencia e incremento en número de agregados en solución a lo largo de la conservación. Los resultados obtenidos no se relacionaron con los de hidrofobicidad superficial, debido probablemente a la influencia de la agregación de la AMN de los extractos en ambas medidas.

#### **4.7.- SISTEMAS MODELO DE PROTEINA AISLADA**

En los sistemas modelo se estudió el efecto del FA, la congelación y conservación por congelación y ambos factores combinados sobre la AMN aislada de las especies que se estudian en el presente trabajo de tesis (Bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A)). Para ello se comparó el comportamiento de la AMN en ausencia de FA con el que exhibe esta en presencia de distintas cantidades de FA durante la congelación y conservación por congelación

Se hicieron dos sistemas modelo:

SM1: para estudiar el efecto de distintas concentraciones de FA sobre la solubilidad y composición de la proteína soluble a lo largo de la conservación en congelación de la AMN.

SM2: para estudiar la naturaleza de los enlaces implicados en la agregación a lo largo de la conservación en congelación.

##### **4.7.1.- ESTUDIO DE LA CONCENTRACION DE FA (SM1)**

Como se ha indicado en el apartado 3.2.6.2., este sistema modelo se preparó inicialmente con AMN aislada de merluza (SM1 a), posteriormente se preparó con las otras

dos especies: bacalao y bacaladilla (SM1 b). En el SM1, además del lote testigo (T), se estudió la acción de tres concentraciones de FA: 3 mM (lotes F2 y F2'), 6 mM (lote F3) y 120 mM (lote F4). En el SM1 b se realizaron cambios respecto al SM1 a en cuanto a las concentraciones de FA empleadas. Así, no se estudió el efecto de 120 mM de FA aunque se introdujo el estudio del efecto de 1,5 mM de FA (lotes F1 y F1'). También cabe recordar que en el SM1 b se introdujo un lavado del agregado insoluble dentro del protocolo de determinación de la solubilidad (apartado 3.2.6.2.)

Las cantidades de AMN extraída por gramo de proteína de músculo en cada especie fueron: merluza: 0,7; bacalao: 0,7 y bacaladilla: 0.61. Estas están en el rango de lo obtenido en estudios de músculo (apartado 4.3.1.)

#### 4.7.1.1.- Solubilidad en NaCl 0,6 M

##### SM1 a

La figura 4.47. muestra la solubilidad de la AMN aislada de merluza en el lote testigo (T) y con FA añadido (F2') en fresco (0') y durante la conservación en congelación. En la tabla 4.34 se muestra el análisis de varianza para dicha medida en función del tiempo y de la cantidad de FA.

La adición de FA a la muestra en fresco provocó una caída de la solubilidad tanto mayor cuanto mayor fue la cantidad de FA añadido, de tal manera que a concentración 120 mM de FA (F4) la AMN en fresco se insolubilizó totalmente. La adición de FA hasta concentración de 3 mM a la proteína previamente descongelada (F2') disminuyó la solubilidad con respecto al lote control en la misma proporción que lo hizo en fresco. El efecto sobre la proteína descongelada fue similar a lo largo de la conservación.

La congelación provocó una caída de la solubilidad muy superior en los lotes con FA,

# Solubilidad en 0,6M NaCl Merluza (M)

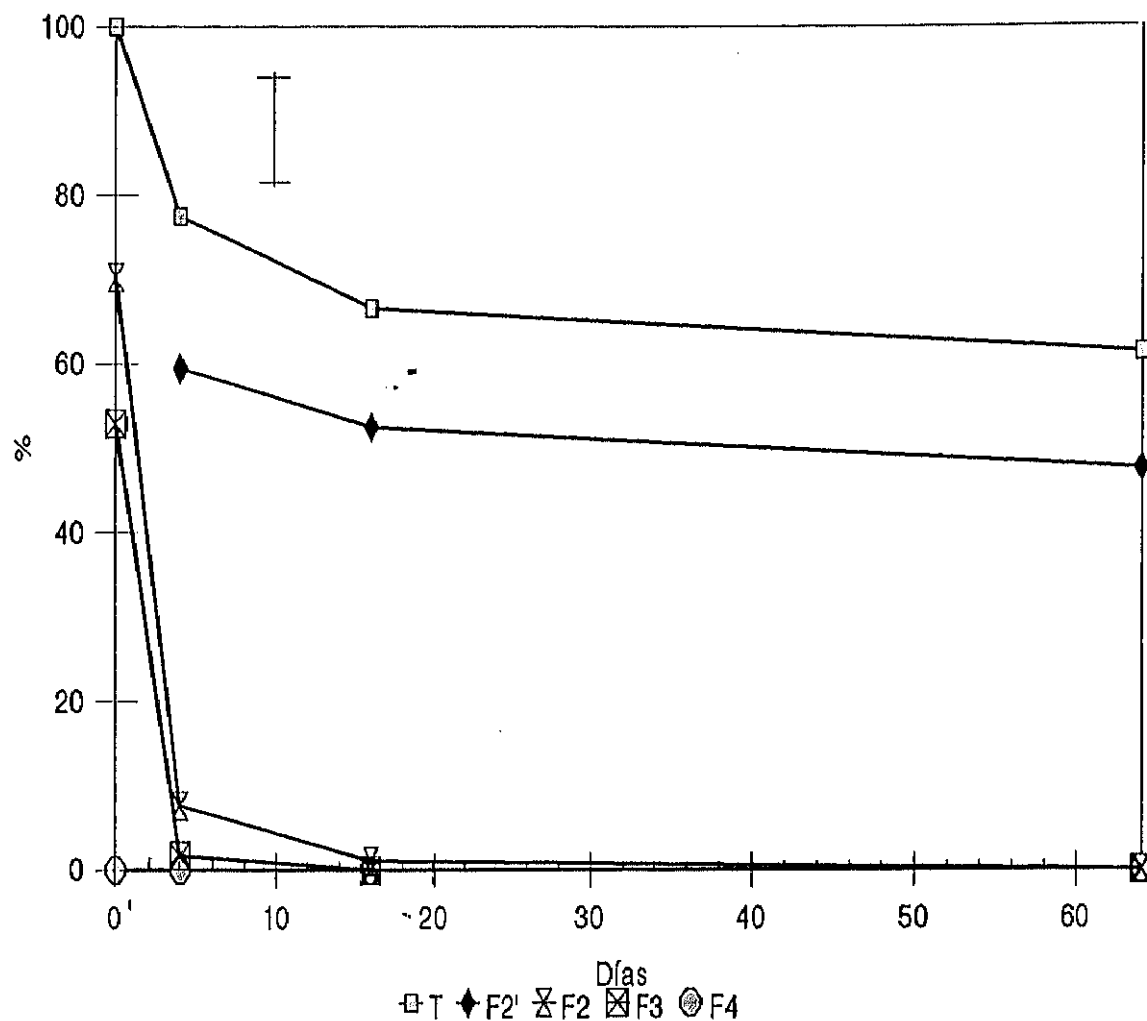


Figura 4.47.- Solubilidad en NaCl 0,6 M de la actomiosina natural (AMN) de merluza (M) conservada en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Lotes: T: testigo; F2' con 3 mM de formaldehído (FA) añadido tras descongelar; F2, F3 y F4 con 3, 6 y 120 mM de FA añadido antes de congelar. 0': control en fresco.

La barra vertical indica el intervalo de confianza al 95% del análisis de varianza en función del tiempo y lote.

observándose valores prácticamente nulos a concentración de FA de 6 mM y 120 mM (lotes F3 y F4). Teniendo en cuenta que en fresco el FA a concentración de 6mM causó una menor insolubilización, esto sugiere que el umbral de concentración de FA que causa un descenso de solubilidad fue menor durante la congelación que en fresco.

Durante la conservación por congelación, el descenso en la solubilidad continuó en todos los lotes de tal forma que a las 16 semanas de conservación todos los lotes con FA se insolubilizaron totalmente.

### SM1 b

Las figuras 4.48. y 4.49. muestran la solubilidad de la AMN aislada de bacalao y bacaladilla en el lote control y con FA añadido antes de congelar (tiempo 0) y durante la conservación en congelación. En la tabla 4.35. se muestra el análisis de varianza de los datos de solubilidad para cada especie en función del tiempo y de la cantidad de FA añadido. En la tabla 4.36. se muestra el análisis de varianza de los datos de solubilidad en función del tiempo y de la especie para cada cantidad de FA añadido.

En bacalao (figura 4.48.), al igual que en merluza (figura 4.47.), la adición de FA a la muestra en fresco provocó una caída de la solubilidad (F1'). Esta fue mayor en el lote con 6mM de FA añadido (F3) , aunque no hubo diferencias entre los lotes con 1,5 y 3 mM de FA añadido (F1 y F2).

La congelación produjo un descenso en la solubilidad respecto al fresco en todos los lotes, siendo este menor en el lote con FA 6mM. No se observaron diferencias entre los lotes con 1,5 mM y 3 mM de FA añadido (F1 y F2). Estos lotes presentaron valores de solubilidad superiores al lote con 6 mM de FA añadido (F3). Por consiguiente, tanto en fresco como durante la congelación, no hubo diferencias en solubilidad debido a la acción de concentraciones 1,5 y 3 mM de FA añadidas. Durante la conservación se observó una tendencia hacia la uniformidad del efecto de las distintas concentraciones de FA. Cuando el FA se añadió tras

Solubilidad en 0,6M NaCl  
Bacalao (B)

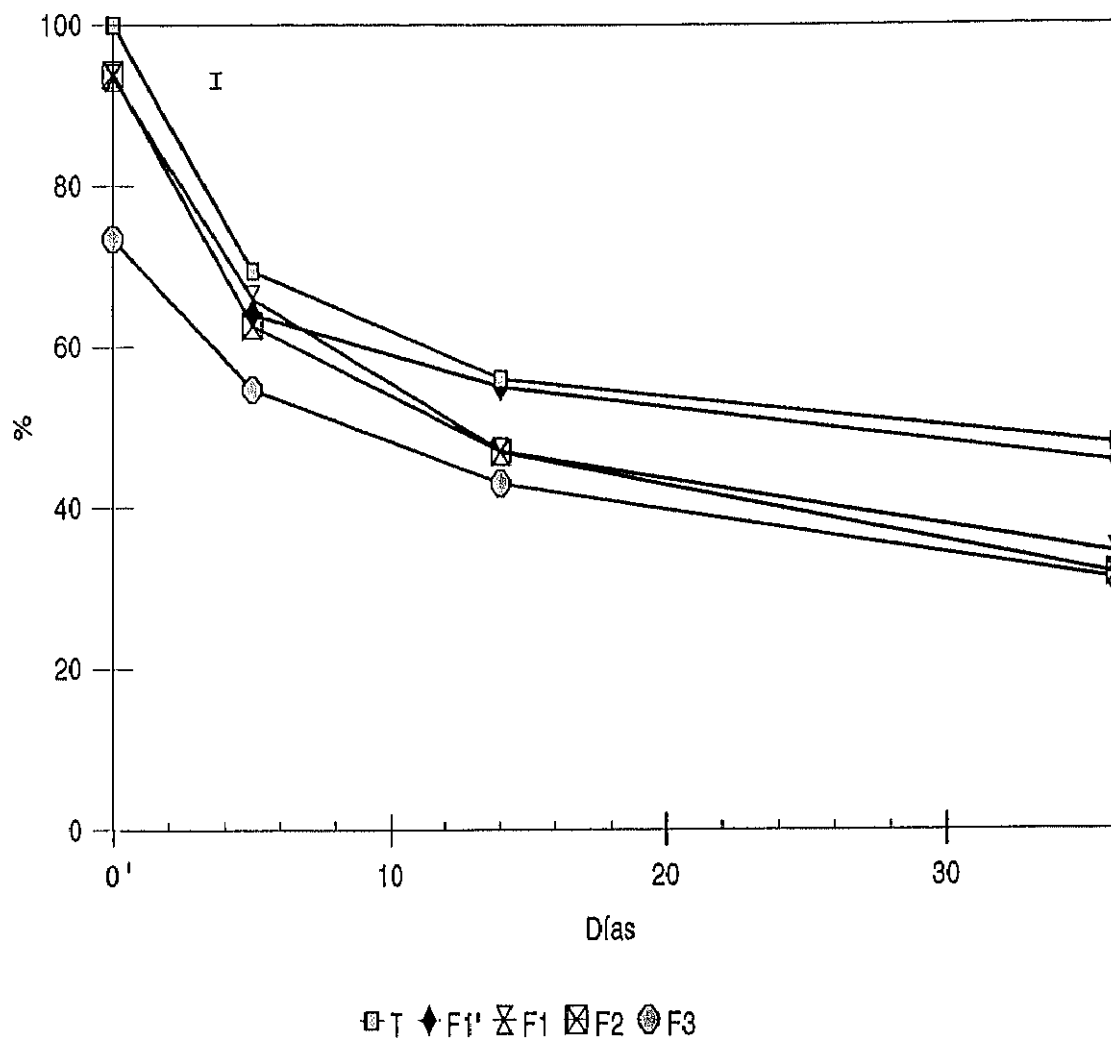


Figura 4.48.- Solubilidad en NaCl 0,6 M de la actomiosina natural (AMN) de bacalao (B) conservada en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Lotes: T: testigo; F1' con 1,5 mM de formaldehído (FA) añadido tras descongelar; F1, F2 y F3 con 1,5, 3 y 6 mM de FA añadido antes de congelar. 0': control en fresco.

La barra vertical indica el intervalo de confianza al 95% del análisis de varianza en función del tiempo y lote.



Solubilidad en 0,6M NaCl  
Bacaladilla (A)

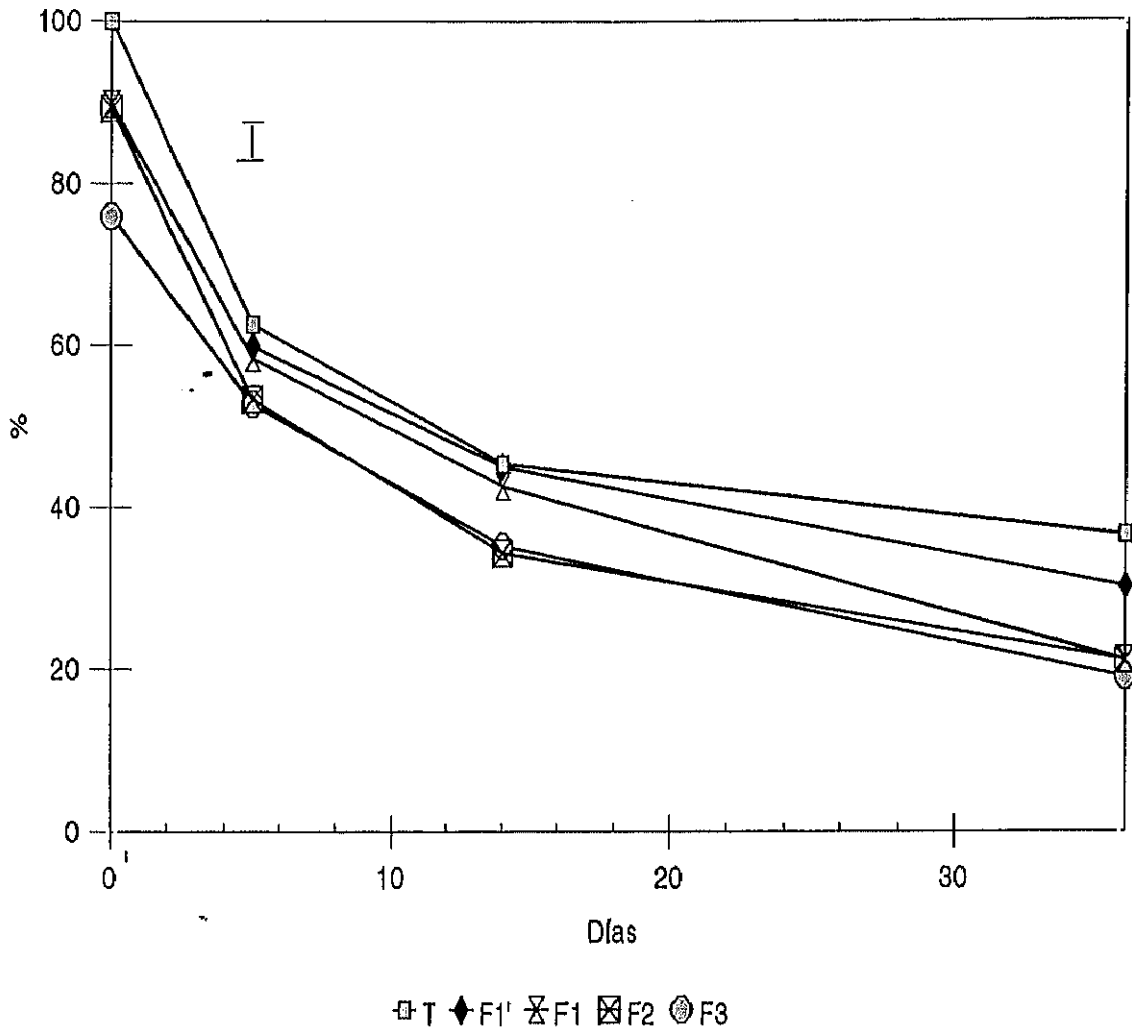


Figura 4.49.- Solubilidad en NaCl 0,6 M de la actomiosina natural (AMN) de bacaladilla (A) conservada en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Lotes: T: testigo; F1' con 1,5 mM de formaldehído (FA) añadido tras descongelar; F1, F2 y F3 con 1,5, 3 y 6 mM de FA añadido antes de congelar. 0': control en fresco.

La barra vertical indica el intervalo de confianza al 95% del análisis de varianza en función del tiempo y lote.

	TIEMPO	LOTE	TIEMPO x LOTE
BACALAO (B)	***	***	—
MERLUZA (M)	***	***	**
BACALADILLA (A)	***	**	—

Tabla 4.34.— Análisis de la varianza correspondiente a las distintas valores de solubilidad obtenidos de la actomiosina de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) conservada en congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 días (bacalao y bacaladilla) y 60 días (merluza) en función del tiempo de conservación y del lote estudiado (testigo (T); con 1,5 mM de formaldehído (FA) añadido tras descongelar (F1') y con FA añadido en fresco y antes de congelar hasta concentraciones de 1,5, 3 y 6 mM (F1, F2 y F3))

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
T	***	***	—
F1'	***	***	—
F1	***	***	—
F2	***	***	—
F3	***	***	—

Tabla 4.35.— Análisis de la varianza correspondiente a los valores de solubilidad obtenida en los lotes de actomiosina de bacalao (B) y bacaladilla (A) conservada en congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 días en función de la especie y del tiempo de conservación. T = lote testigo; F1' = lote con 1,5 mM de formaldehído (FA) añadido tras descongelar; F1, F2 y F3 = lotes con FA añadido en fresco y antes de congelar hasta concentraciones de 1,5, 3 y 6 mM.

TIEMPO x ESPECIE y TIEMPO x LOTE = Interacciones entre el efecto del tiempo y los de la especie y lote estudiado

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

— = Efecto no significativo

descongelar (F1') se observó un ligero descenso de la solubilidad respecto al lote testigo (T). A diferencia de lo observado en merluza, no existió proporcionalidad de dicho descenso respecto a valor del lote testigo a lo largo de la conservación. Sin embargo, al encontrarse las diferencias entre ambos lotes en el límite de la significatividad, no se puede descartar la posibilidad de que la insolubilización sea proporcional al valor del lote testigo. Esto se observó en merluza (SM1 a), aunque en dicha especie se utilizó una concentración de 3mM de FA.

En bacaladilla (figura 4.49.) se observó también un descenso de la solubilidad debido a la adición de FA en fresco (F1'). El descenso fue similar a concentraciones de 1,5 y 3 mM (F1 y F2) y menor que a concentración 6mM (F3). En general, esta disminución fue similar a la observada en bacalao encontrándose diferencias entre la insolubilización producida por el FA añadido a concentración de 1,5 mM (F1) y a concentraciones de 3 ó 6 mM (F2 y F3). Estas dos últimas concentraciones de FA provocaron un efecto similar, lo cual sugiere que, en bacaladilla y al igual que se observó en merluza, la congelación causa un descenso del umbral de concentración de FA necesario para provocar una caída de la solubilidad.

A lo largo de la conservación, los valores de solubilidad en todos los lotes fueron algo menores en bacaladilla que en bacalao, sobre todo al final de la misma. El efecto inicial de la concentración de FA fue importante, pero en etapas avanzadas de conservación sólo hubo diferencias entre los lotes con FA y el lote control.

En las tres especies, la congelación y conservación en congelación produjo una caída de la solubilidad. Esto ha sido observado anteriormente por distintos autores en estudios con proteína miofibrilar aislada de diversas especies (Tsuchiya y col. 1979; Jiang y col., 1988 a y b y 1989; Ang y Hultin, 1989; Careche y Tejada, 1991 y 1994; Cofrades, 1994). Esta rápida pérdida de solubilidad observada inmediatamente después de congelar en los lotes testigo (T) es inducida por el proceso de congelación y descongelación en si mismo que da lugar a fenómenos de desnaturalización y agregación. Tsuchiya y col. (1975) y Oguni y col. (1975) en AMN de carpa y Jarënback y Liljemark (1975) en AMN de bacalao, ilustraron por microscopía electrónica este proceso de agregación. Oguni y col. (1975) encontraron que los

filamentos de actomiosina descongelada inmediatamente después de congelar se agregaba lateralmente y en cruz.

También en las tres especies, el FA provocó un descenso de la solubilidad respecto al lote testigo tanto en fresco como durante la congelación y conservación en congelación. Este efecto fue mayor cuanto mayor fue la concentración de FA, aunque no se observó proporcionalidad entre la concentración y el efecto insolubilizante. En bacalao y bacaladilla se detectó un incremento de la acción del FA al aumentar el tiempo de conservación. Esto último no se observó en merluza, debido probablemente a que la insolubilización fue máxima desde las etapas iniciales de la conservación.

Se encontró sinergismo entre la acción del FA y la congelación en merluza, puesto que la insolubilización que este provocó durante la congelación fue mayor que la observada en fresco. Estos resultados coinciden con los de Ang y Hultin (1989) en miosina parcialmente purificada de bacalao. Sin embargo este sinergismo no se observó en bacalao y bacaladilla y tampoco lo observó Cofrades (1994) en AMN aislada de merluza. Por tanto, el efecto desnaturizante del FA durante congelación y descongelación puede o no ser superior al efecto en fresco.

Existen en la literatura muchos estudios *in situ* en los que se relaciona el FA, tanto exógeno como endógeno con la insolubilización proteica. Connell (1975), estudiando la acción del FA exógeno sobre músculo de bacalao conservado en congelación, planteó la posible mayor reactividad del FA con las proteínas previamente desnaturizadas. Sin embargo, nuestros resultados indican lo contrario, ya que la acción del FA sobre la proteína fresca fue mayor o igual a la observada cuando el FA fue añadido sobre una proteína previamente desnaturizada tras se sometida a un ciclo de congelación y descongelación a lo largo de del tiempo.

#### 4.7.1.2.- Electroforesis (SDS-PAGE)

##### SM1 a

Se utilizaron geles al 12,5% y al 7,5% . En estos últimos, se empleó el doble de tiempo que en los geles al 12,5% para así poder aislar los pesos moleculares más altos observados en la zona de aplicación (pico 1) en los geles al 12,5%

##### Control en fresco (0')

Los resultados de la electroforesis al 12,5 % de la AMN aislada en NaCl 0,6 M en fresco (figura 4.50. a, '1') muestran que las dos bandas mayoritarias fueron CPM (pico 3) y Ac (pico 5).

Se observó que cuando se añadieron cantidades crecientes de FA a la AMN de merluza, la intensidad de las bandas de CPM y Ac disminuyó, incrementándose en proporción la de las bandas de la zona 6 (correspondientes a las proteínas TM, TN y CLMs). Cuando la concentración de FA fue de 3mM (F2-2') o de 6mM (F3), se detectaron en el gel agregados de peso molecular superior al de la miosina (X). Los geles al 7,5% de poliacrilamida confirmaron la presencia de dichos agregados (Fig.4.49. b, X), aunque no se ha establecido el peso molecular de los mismos. También se observó un incremento de la intensidad de la banda situada en la zona de aplicación de la muestra (pico 1), que corresponde a proteína de alto peso molecular agregada que no entra en el gel. Estos agregados no se rompieron en las condiciones de tratamiento de la muestra para electroforesis, por lo que se trataría de proteínas unidas por medio de enlaces covalentes no disulfuro. No pudo estudiarse el sobrenadante correspondiente al lote con 120 mM de FA (F4) porque la concentración proteica del mismo fue muy baja.

## Merluza Fresco

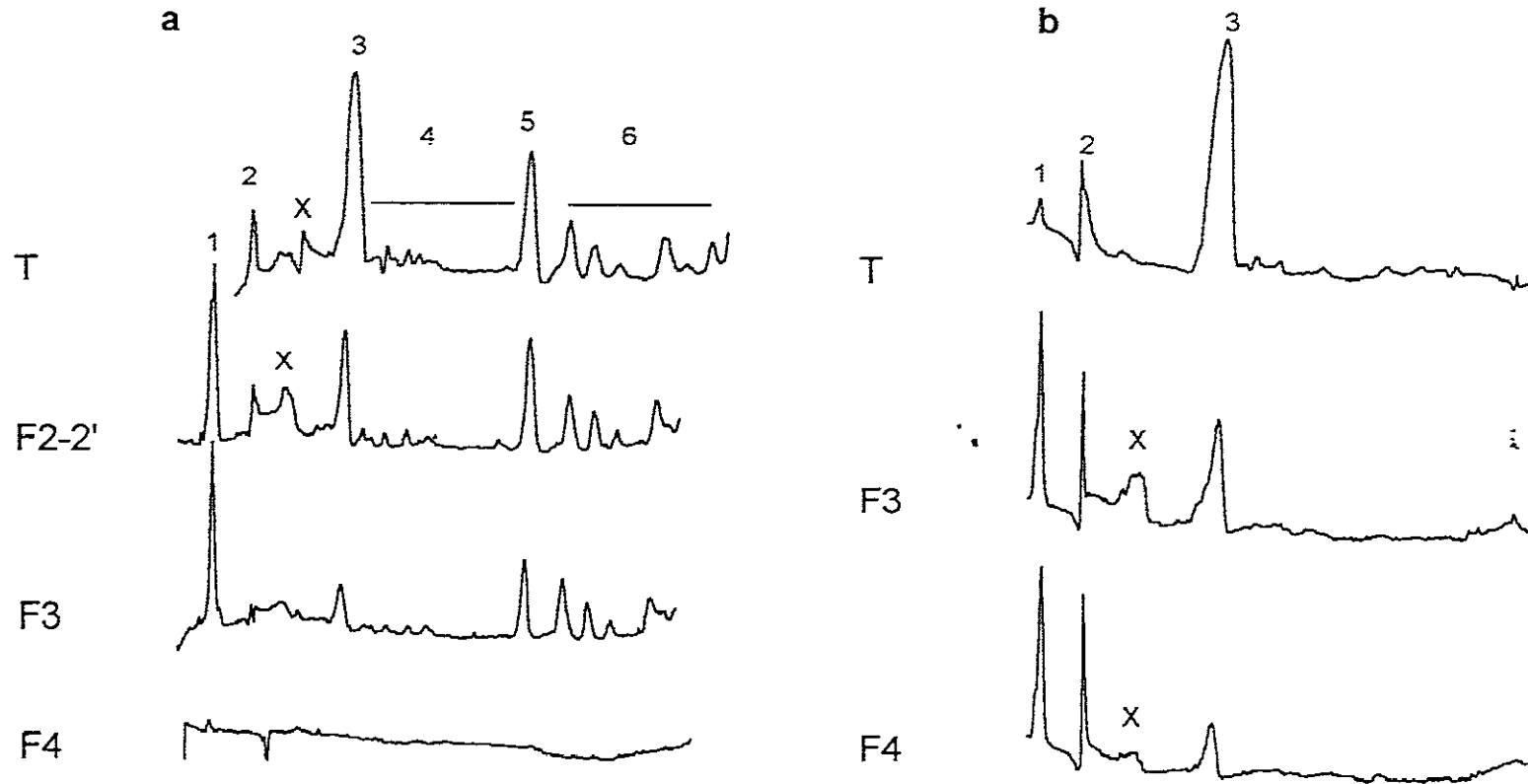


Figura 4.50.- Perfiles electroforéticos de la actomiosina natural (AMN) de merluza (M) soluble en NaCl 0,6 M en fresco. a) geles de 12,5%; b) geles al 7,5%. T: lote testigo; F2-2': lote con 3 mM de formaldehído (FA) añadido tras descongelar F3, F4: lotes con 6 y 120 mM añadidos antes de congelar. Picos identificados en apartado 4.4.1.

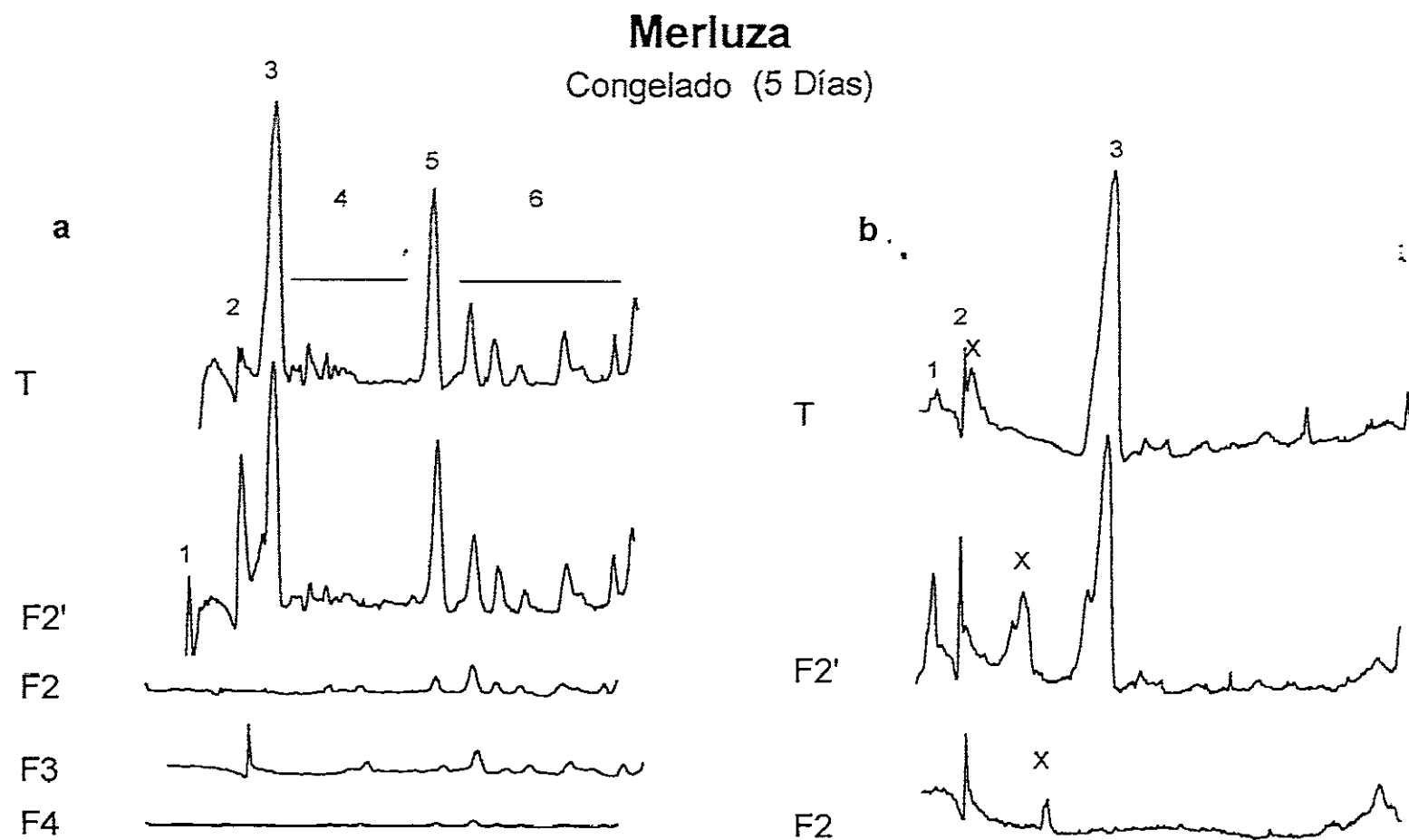


Figura 4.51.- Perfiles electroforéticos de la actomiosina natural (AMN) de merluza (M) soluble en NaCl 0,6 M a los 5 días de conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . a) geles de 12,5%; b) geles al 7,5%. T: lote testigo; F-2': lote con 3 mM de formaldehído (FA) añadido tras descongelar F2, F3, F4: lotes con 3, 6 y 120 mM añadidos antes de congelar. Picos identificados en apartado 4.2.1.

**Merluza**  
Congelado

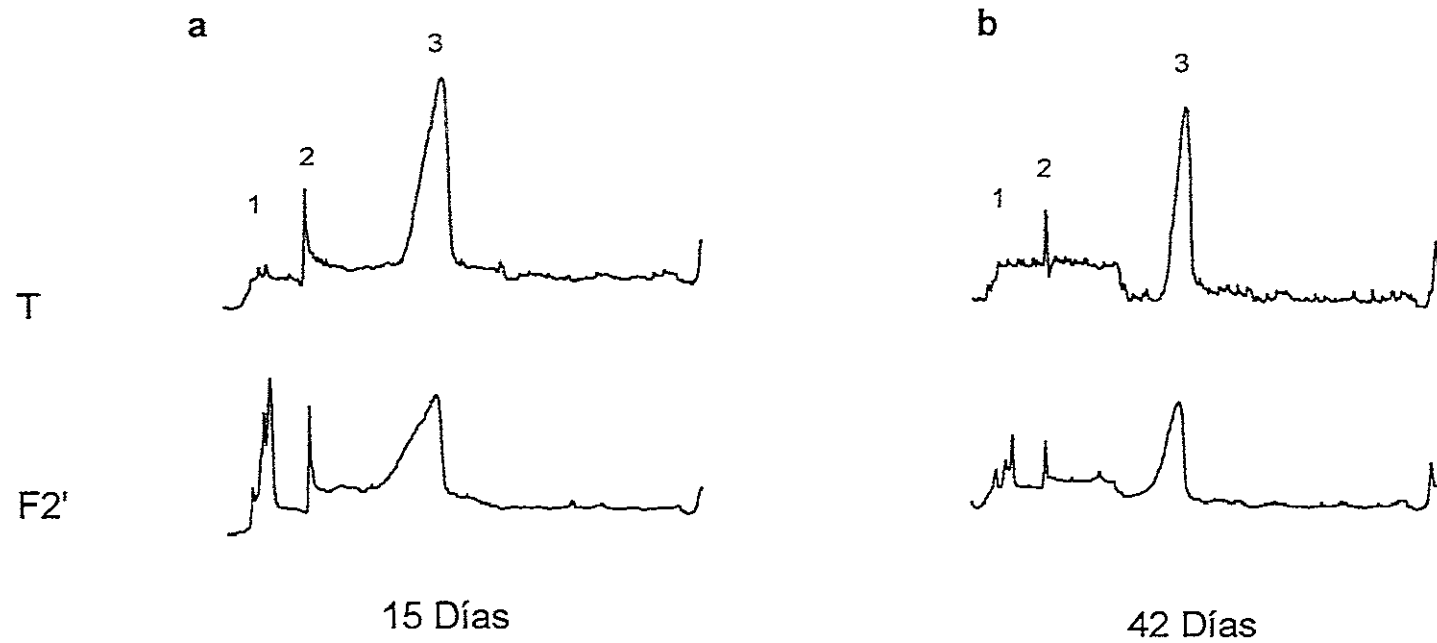


Figura 4.52.- Perfiles electroforéticos de la actomiosina natural (AMN) de merluza (M) soluble en NaCl 0,6 M a los 15 (a) y 42 (b) días de conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Geles al 7,5%. T: lote testigo; F-2': lote con 3 mM de formaldehído (FA) añadido tras descongelar. Picos identificados en apartado 4.2.1.



### Control a los 5 días de conservación

Las figuras 4.51. a y b muestran los perfiles electroforéticos (geles al 12,5 y 7,5 % respectivamente) de los sobrenadantes de las muestras congeladas y descongeladas a los 5 días. En la figura 4.51. a se observa que en ausencia de FA (T) el densitograma no presentó diferencias importantes con respecto al de la muestra en fresco (figura 4.50. a, T). Cuando se añadió FA 3 mM a las muestras descongeladas (figura 4.51. a, F2') se observaron cambios en el perfil de la proteína soluble respecto al del correspondiente testigo (figura 4.51., T). Así, hubo una disminución en la proporción de la intensidad de la banda de la CPM y un aumento de la intensidad del pico 2, correspondiente a agregados que no se rompen en las condiciones de preparación de la muestra. Estos agregados se pueden ver mejor en las electroforesis en geles al 7,5% de los lotes S3 y S3' (figura 4.51. b , pico X). En las muestras congeladas con FA (figura 4.51. a, F2, F3 y F4) la concentración de proteína del sobrenadante fue tan pequeña que no se detectaron apenas bandas en el gel al 12,5%.

### Controles a los 15 y 42 días de conservación

En los geles al 12,5% no se observaron cambios por efecto de la conservación en congelación en el lote testigo (T) ni cuando se añadió sobre este 3 mM de FA tras descongelar (F2') (no se muestran resultados). Por otro lado, cuando se añadió FA antes de congelar y conservar en congelación durante el mismo periodo, el descenso de concentración de la proteína soluble fue tan grande que no se pudieron observar bandas en los geles (no se muestran los resultados).

En las figuras 4.52. a y b se muestran los perfiles de las electroforesis en geles al 7,5% de los lotes testigo (T) (a) y con 3 mM de FA añadido tras descongelar (F2') (b) (los únicos cuyos sobrenadantes presentaron concentración proteica suficiente para poder ser estudiados) a los 15 y 42 días de conservación. Estas se realizaron para descartar la posibilidad de existencia de agregados, los cuales no fueron detectados en los geles al 12,5 %. Aunque se encontró un incremento del pico 1 en el lote con 3 mM de FA añadido tras

descongelar (F2') a los 15 días, no se observaron bandas correspondientes a agregados (X) en ninguno de los dos lotes. Por otra parte, el incremento observado en el pico 1 a los 15 días desapareció a los 42 días de conservación. Todo ello indica que probablemente los agregados formados en las etapas finales de la conservación en congelación tuvieron un peso molecular demasiado grande como para ser solubilizados en las condiciones de trabajo, por eso sólo fue posible detectarlos en el pico 1 en el caso del lote con 3 mM de FA añadido antes de congelar (F2) pero no dentro de los geles, como había sucedido en controles anteriores en ambos lotes.

## SM1 b

### Control en fresco (0')

Los resultados de la electroforesis de las proteínas solubles en sal en fresco (figura 4.53. T) indican que, al igual que en merluza, las dos bandas mayoritarias fueron CPM (pico 3) y Ac (pico 5). En los lotes correspondientes a la proteína fresca a la que se añadió FA a distintas concentraciones (figura 4.53. F1-1': FA 1,5 mM, F2: FA 3mM y F3: FA 6mM) se observa que el FA no causó cambios en el perfil electroforético de la proteína soluble, aunque si dio lugar a una bajada en la solubilidad (figuras 4.48. y 4.49.) apreciable. El que el pico 1 sea tan predominante en bacaladilla pone de manifiesto la presencia de agregados de PM superior al de la CPM incluso en la muestra testigo (T). Esto coincide en parte con lo obtenido en merluza (SM1a), en la cual se observó la aparición de agregados en las fracciones solubles de los lotes con FA 3 y 6 mM (figuras 4.50 a y b, F2-2'y F3 ) tanto por un incremento del pico 1, como por la aparición del pico X en los geles al 12,5 % y al 7,5 %. En merluza, sin embargo, no se observó ningún indicio de la presencia de agregados en el sobrenadante del lote testigo (T) en fresco.

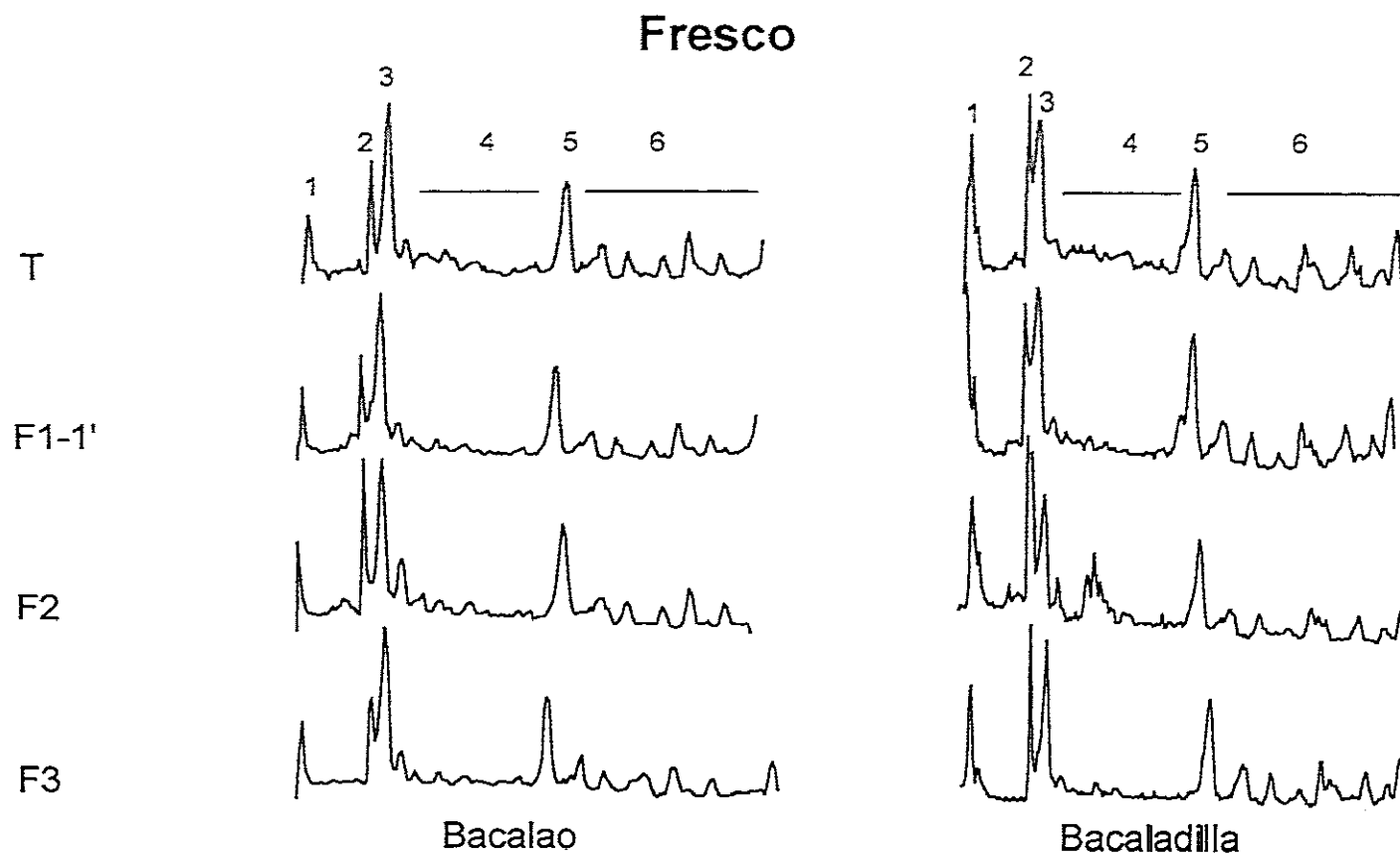


Figura 4.53.- Perfiles electroforéticos de la actomiosina natural (AMN) de bacalao y bacaladilla soluble en NaCl 0,6 M en fresco. Geles al 7,5%. T: lote testigo; F1-1', F2 y F3: lotes con 1, 5, 3 y 6 mM de formaldehído (FA) añadido. Picos identificados en el apartado 4.2.1.

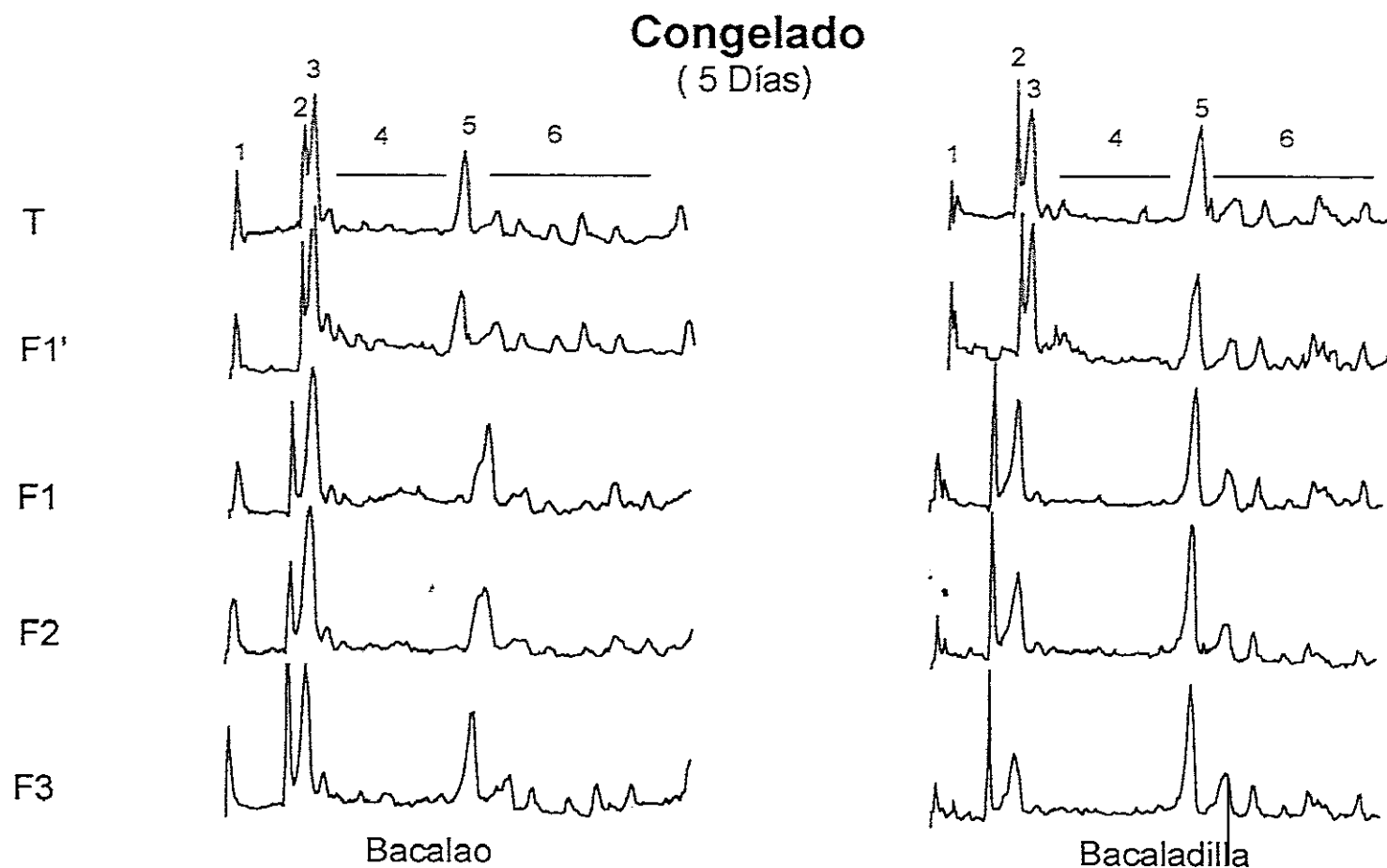


Figura 4.54.- Perfiles electroforéticos de la actomiosina natural (AMN) soluble en NaCl 0,6 M de bacalao y bacaladilla a los 5 días de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . T: lote testigo; F1': lote con 1,5 mM formaldehído (FA) añadido tras descongelar, F1, F2 y F3: lotes con 1, 5, 3 y 6 mM de FA añadido antes de congelar. Picos identificados en apartado 4.2.1.

### Control a los 5 días de conservación

Los resultados obtenidos para los sobrenadantes de las muestras congeladas durante 5 días se muestran en la figura 4.54, tanto para bacalao (B) como para bacaladilla (A). En esta se puede observar que la congelación en ausencia de FA (T) no dió lugar a cambios respecto al fresco en los perfiles electroforéticos en ambas especies. Esto coincide con lo observado en merluza (figuras 4.50. a y 4.51. a ).

Tampoco se observó ningún cambio cuando se añadió 1.5mM de FA a las muestras previamente descongeladas (F1') de ambas especies, mientras que en merluza tuvo lugar la aparición de agregados (figura 4.51. a y b, F2'), aunque hay que tener en cuenta que en esta especie la cantidad de FA añadida fue el doble.

En bacalao tampoco se observaron cambios en los perfiles correspondientes a los lotes con FA añadido antes de congelar (figura 4.54., B, lotes F1, F2 y F3). Esto sugiere que en dicha especie, la acción combinada del FA y la congelación, insolubilizó por igual todas la proteínas. Sin embargo en bacaladilla (figura 4.54., A, lotes F1, F2 y F3), dichos efectos combinados fueron responsables de cambios en la proporción de las distintas proteínas en la AMN soluble, ya que en los perfiles electroforéticos correspondientes se observó una disminución de la intensidad del pico de la cadena pesada de miosina que se corresponde con un ligero aumento en la proporción de Ac (pico 5) y proteínas en la zona 6 (TM fundamentalmente). Dicho efecto fue más evidente a mayor concentración de FA. También se observó en todos los lotes de esta especie una disminución del pico 1 respecto del observado en fresco, indicando que los agregados formados por efecto de la congelación y conservación tienen un peso molecular demasiado grande como para ser solubilizados en las condiciones de trabajo.

En general, se pudo comprobar que la congelación con FA produjo muchos más cambios en el perfil de los lotes de AMN de bacaladilla, lo que sugiere una mayor sensibilidad de la AMN de bacaladilla a la acción conjunta de ambos factores. Esto coincide además con los menores valores de solubilidad encontrados en bacaladilla en todos los lotes tras congelar y descongelar.

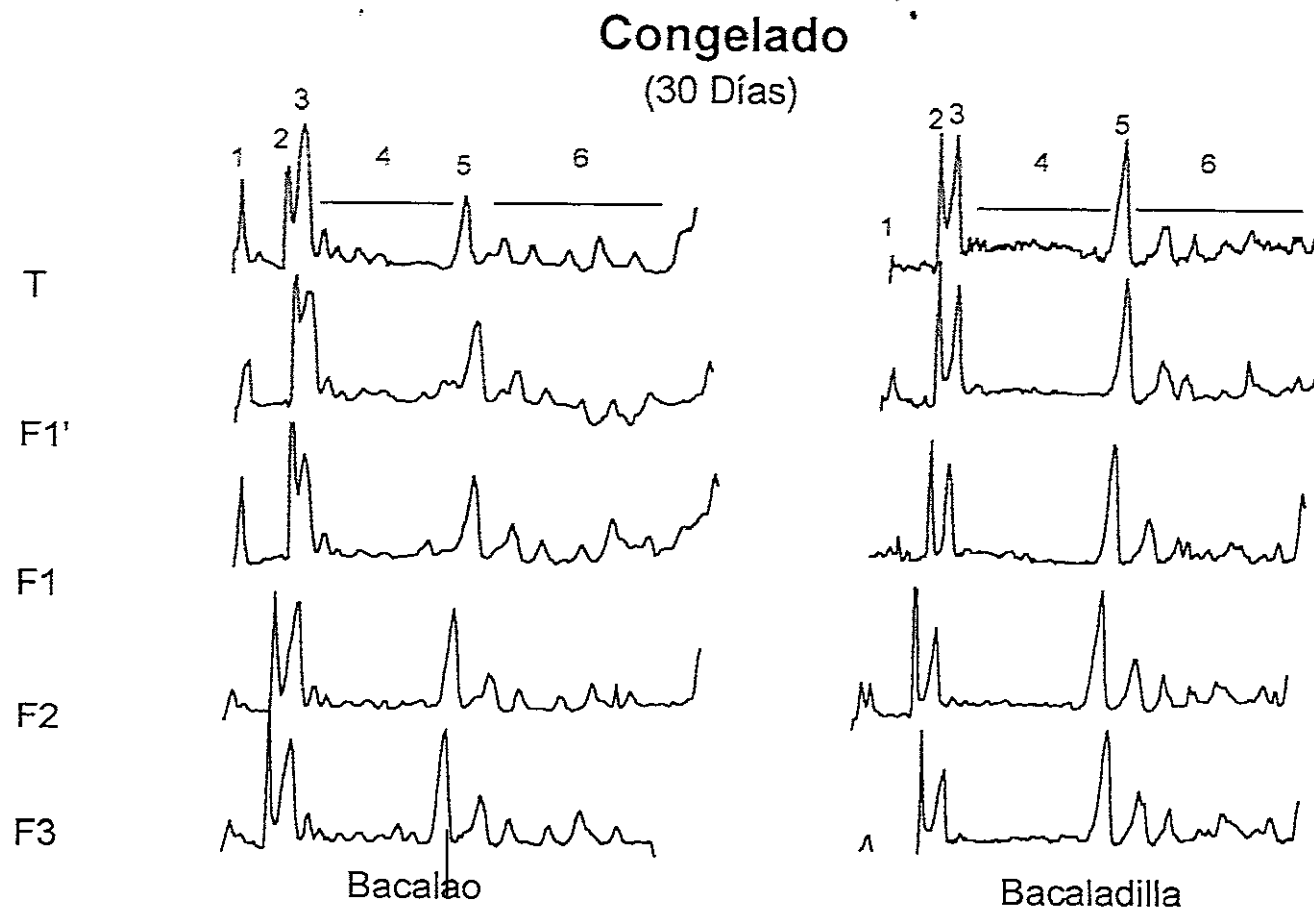


Figura 4.55.— Perfiles electroforéticos de la actomiosina natural (AMN) soluble en NaCl 0,6 M de bacalao y bacaladilla a los 30 días de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . T: lote testigo; F1': lote con 1,5 mM formaldehído (FA) añadido tras descongelar; F1, F2 y F3: lotes con 1, 5, 3 y 6 mM de FA añadido antes de congelar. Picos identificados en apartado 4.2.1.

No es posible comparar estos resultados con lo obtenido en merluza (figura 4.51., F2, F3 y F4) puesto que en las condiciones empleadas en dicha especie (apartado 3.2.6.), la insolubilización por acción de la mismas concentraciones de FA fue mucho mayor, como ya se ha comentado, y por tanto no se pudo obtener un perfil electroforético claro debido a la poca concentración de proteína de la muestra.

#### Control a los 30 días de conservación

En la figura 4.55. se representan los perfiles electroforéticos de la proteína soluble de las muestras de AMN almacenada en congelación durante un periodo de 30 días. En bacalao, en ausencia de FA (T) no se observaron cambios en los perfiles respecto de la muestras congeladas durante 5 días (figura 4.54., B). Sin embargo en bacaladilla hubo una disminución de la intensidad del pico de miosina (pico 3) y un aumento de los picos de Ac (pico 5) y proteínas de la zona 6 (TM, TNs y CLMs).

En ambas especies, cuando se añadió 1.5mM de FA a la AMN descongelada (F1') no se produjo ninguna alteración en el patrón electroforético respecto al de la proteína almacenada en congelación sin FA (T). Esto fue diferente a lo obtenido en merluza (figura 4.52. a y b ), donde se había observado una disminución en el pico de miosina a los 15 y 42 días de conservación, aunque en esta especie la cantidad de FA añadida fue el doble y la insolubilización que se produjo fue mucho más alta que en este caso.

En bacalao la conservación en congelación con FA durante 5 días no había producido un efecto apreciable en los perfiles de bacalao respecto al fresco (figura 4.54., B, lotes F1, F2 y F3). Sin embargo, en esta especie, en los lotes con 3 y 6 mM de concentración de FA, al aumentar el tiempo de conservación en congelación (figura 4.55., B, lotes F2 y F3) se observó una disminución en la intensidad del pico de la CPM (pico 3) y un aumento de la intensidad de los picos de Ac (pico 5) y TM (zona 6, pico a). En estos lotes se observó también una disminución de la intensidad del pico 1. La disminución de dicho pico indica que hubo menos

agregados en los sobrenadantes de los lotes F2 y F3, lo cual puede deberse a que estos son de peso molecular mayor y no se solubilizan, pasando a formar parte del precipitado insoluble.

En bacaladilla, el aumento del tiempo de conservación en congelación a 30 días no causó nuevos cambios respecto de los observados a los 5 días en los perfiles electroforéticos de los lotes con FA añadido antes de congelar, como se observa comparando los perfiles de los lotes F1, F2 y F3 de bacaladilla de la figura 4.55. con los correspondientes en la figura 4.54.

En general, del estudio electroforético se puede concluir que la congelación y conservación en congelación se observó una implicación similar de todas las proteínas. Durante la congelación y la conservación en congelación El FA provocó una mayor agregación de la AMN acompañada de una mayor implicación de la miosina en esta y de la aparición de agregados covalentes que se detectaron en los picos 1 y 2 y que en merluza fueron identificados en los geles al 7,5%.

En merluza, cuando el FA se añadió a la proteína en fresco o sometida a desnaturalización previa por un ciclo de congelación y descongelación se observó mayor implicación de la miosina en la agregación y se detectaron agregados covalentes solubles. Sin embargo, en bacalao y bacaladilla, en lotes similares se observó participación de todas las proteínas por igual en la agregación y no se detectaron agregados covalentes solubles, lo cual se podría relacionar con el menor efecto insolubilizante del FA sobre la AMN fresca de estas últimas.

#### 4.7.2.- ESTUDIO DE LA AGREGACION DE AMN AISLADA

En el apartado 2.2. se indicó que a partir del SM1 se seleccionó la cantidad de FA a añadir a la AMN para poder estudiar la naturaleza de los enlaces implicados en la fracción insoluble en sal formada durante la congelación y conservación de AMN aislada en presencia o no de FA. Este estudio se llevó a cabo en el SM2 utilizando 10 mg/ml de concentración de AMN y 6 mM de concentración de FA. Se empleó mayor concentración de proteína para



evitar problemas de baja sensibilidad en la determinación de la concentración proteica cuando se realiza el estudio de extractabilidad del agregado. Para cada especie se realizaron dos lotes: testigo (T), sin FA y con 6 mM de FA añadido (F). Como se ha indicado en el apartado 3.2.6., en este estudio se realizó lavado del precipitado al igual que en SM1b.

El estudio de la naturaleza de la agregación de la AMN aislada de las tres especies así como del efecto del FA añadido a la AMN antes o después de congelar, se ha abordado en el presente sistema modelo de forma similar a como se hizo en el estudio de extractabilidad de proteínas miofibrilares de músculo (apartado 4.3.). Es decir, se han analizado los valores de solubilidad en ClNa y de extractabilidad del agregado insoluble en NaCl 0,6 M (P1) de manera comparativa entre las tres especies (bacalao, merluza y bacaladilla) y se han estudiado los resultados obtenidos en cada lote por separado para así conseguir una visión general del proceso de agregación en cada una de ellas.

Las cantidades de AMN extraída del músculo en cada especie fueron (en gramos de AMN por gramo de proteína de músculo): bacalao: 0.65 ; merluza: 0.63 ; bacaladilla: 0,55.

#### **4.7.2.1.- Solubilidad en NaCl 0,6 M (S1)**

La figura 4.56. muestra la solubilidad de la AMN aislada de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) en los lotes testigo (T) y con FA añadido (F) en fresco (0') y durante la conservación en congelación. Las tablas 4.36. y 4.37. recogen los resultados de los correspondientes análisis de varianza de los datos anteriores en función del tiempo y la especie y las tablas 4.38. y 4.39. en función del tiempo y la adición de FA. El intervalo de confianza correspondiente a los análisis de varianza en función del tiempo y de la especie para los lotes control y con FA se muestra en las gráficas correspondientes en forma de barra.

En las tres especies, la congelación en ausencia de FA causó un descenso inicial en la solubilidad en NaCl 0,6 M. A diferencia de lo encontrado en merluza y bacaladilla, en el lote control de bacalao la solubilidad mostró una descenso más gradual a lo largo de todo el

# Solubilidad en 0,6M NaCl (S1)

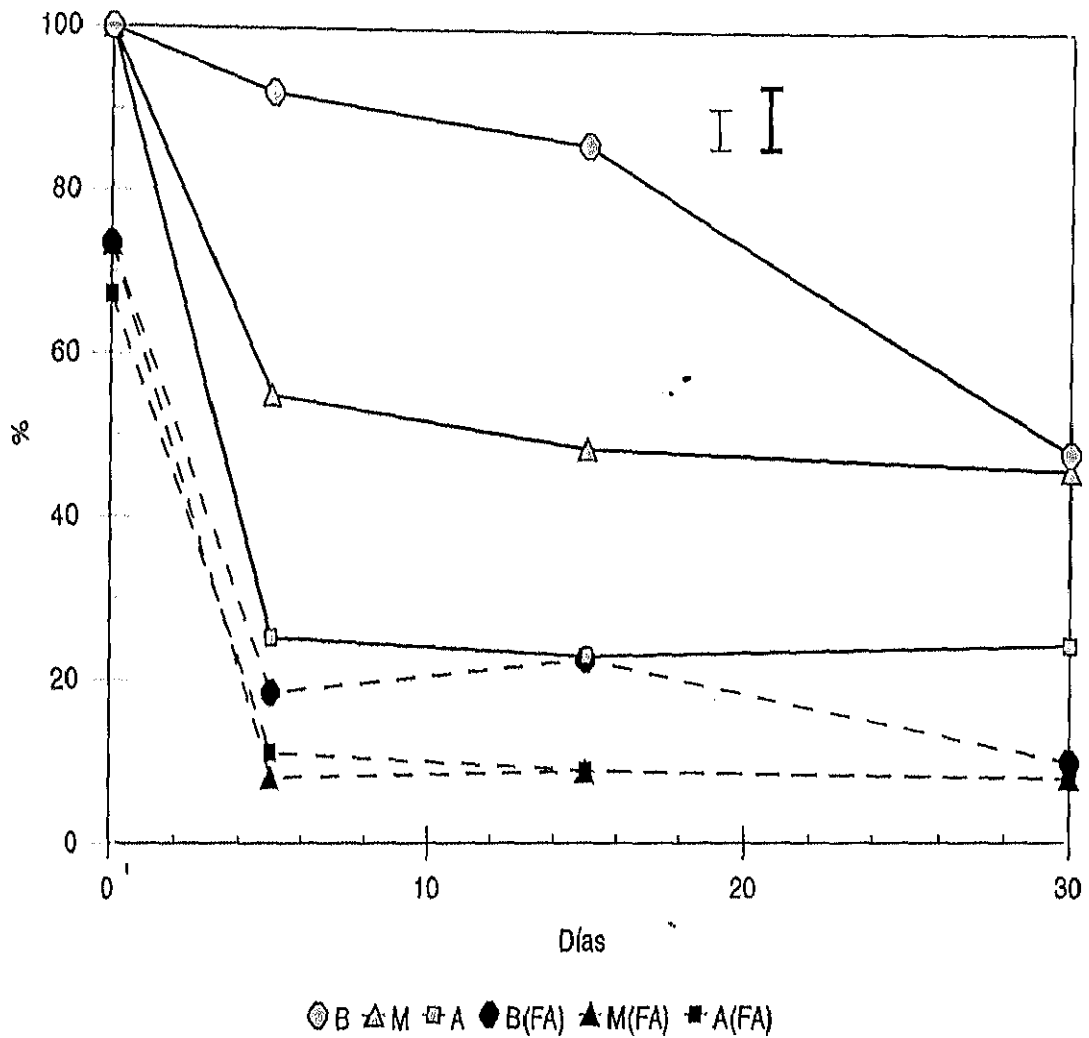


Figura 4.56.- Solubilidad en NaCl 0,6 M de la actomiosina natural (AMN) de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A). B, M y A lotes testigo. B (FA), M (FA) y A (FA) lotes con 6 mM de FA añadido. 0': control en fresco.

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95% La de trazo fino corresponde a los lotes con FA, la de trazo grueso a los lotes testigo.

periodo de conservación, alcanzando valores similares a los del lote de merluza al final del estudio.

La adición de FA a la AMN en fresco causó un descenso inmediato en la cantidad de proteína soluble que fue similar en las tres especies (sobre el 30%). Este efecto también se detectó en el SM1 (figura 4.47.) aunque en bacalao y bacaladilla el descenso fue inferior al encontrado en el presente SM para las mismas especies. Esto podría deberse a la mayor concentración de FA y AMN, que favorecería la reacción entre ambos. Al igual que se observó en merluza en el SM1, la acción insolubilizante del FA se acentuó de manera muy importante cuando las muestras de merluza y bacalao fueron congeladas. Los menores valores de solubilidad observados en las muestras con FA respecto al SM1 (para la misma relación proteína/FA) pueden atribuirse a la mayor concentración de AMN y FA empleada en el presente estudio, ya que una mayor concentración de reactivo y sustrato facilitaría la interacción entre ambos, dando lugar a una mayor agregación.

De los resultados obtenidos en el presente SM en cuanto a solubilidad en NaCl 0,6 M de AMN, tanto en fresco como durante la congelación o por efecto de la conservación en congelación, se pueden inferir las mismas conclusiones generales que se extrajeron del SM1 para las tres especies estudiadas (apartado 4.7.1.1.). Sin embargo los resultados del SM1 y los del presente sistema modelo ponen de manifiesto diferencias en cuanto a cinética de agregación dentro de una misma especie. Esto podría ser debido a la influencia de otros factores como estacionalidad, estado inicial de la muestra, lugar de captura etc., también podrían atribuirse a la distinta concentración de proteína utilizada. Esto pone de manifiesto que los datos existentes en la literatura en cuanto a cinética de agregación hay que interpretarlos con cierta precaución.

En el SM2 no se encontró incremento de la acción del FA 3 con el tiempo de conservación en congelación. Sin embargo, los resultados no descartan este posible efecto, el cual podría no observarse cuando alcanzan valores de insolubilización máximos desde las etapas iniciales de la conservación en congelación, como se explicó en SM1.

Los resultados obtenidos en ambos sistemas modelo no nos permiten afirmar concluir nada respecto a si la acción del FA se incrementa durante la congelación (como afirmaron Ang y Hultin (1989)), ya que, aunque este efecto se observó siempre en merluza, en el lote de bacalao se observaron efectos distintos en ambos sistemas modelo y en bacaladilla no se observó efecto alguno. Por tanto, al igual que se concluyó en el SM1, podría existir sinergismo entre la acción del FA y la congelación, pero en esto parece influir factores distintos de la especie: estacionalidad, estado inicial de la muestra (tamaño, tiempo de mantenimiento en hielo), lugar de captura, etc..

#### 4.7.2.2.- Extractabilidad en SDS 2% (S2) del agregado insoluble en NaCl 0,6 M (P1)

En la figuras 4.57. a y b se representa la extractabilidad en la fracciones S2 (obtenida al tratar con SDS 2% los precipitados insolubles en NaCl 0.6 M (P1) de AMN aislada de bacalao, merluza y bacaladilla en los lotes testigo y con FA añadido. Las tablas 4.36. y 4.37. recogen los resultados de los correspondientes análisis de varianza de los datos anteriores en función del tiempo y la especie y las tablas 4.38. y 4.39. en función del tiempo y la adición de FA. El error estándar correspondiente a los análisis de varianza en función del tiempo y de la especie para los lotes control y con FA se muestra en las gráficas correspondientes en forma de barra.

En los lotes testigo, la cantidad de proteína extraída de P1 inicialmente por 100 mg de proteína total fue mayor en merluza que en las otras dos especies (figura 4.57. a), entre las que no se encontraron diferencias significativas. Los cambios a lo largo del tiempo solo fueron significativos en merluza y bacalao donde hubo una tendencia al aumento. Si se expresan las fracciones S2 en porcentaje respecto de P1 (agregado insoluble en NaCl 0,6 M (figura 4.57. b ), encontramos que del agregado tomado se extrac más proteína en merluza, seguida de bacalao y de bacaladilla, que presentó los valores menores. Hay que tener en cuenta que entre merluza y bacalao las diferencias en porcentaje no fueron significativas a los 5 y 15 días y tampoco entre bacalao y bacaladilla a los 30 días de conservación. Los lotes de merluza y bacalao presentaron valores significativamente superiores al de bacaladilla hasta los 15 días

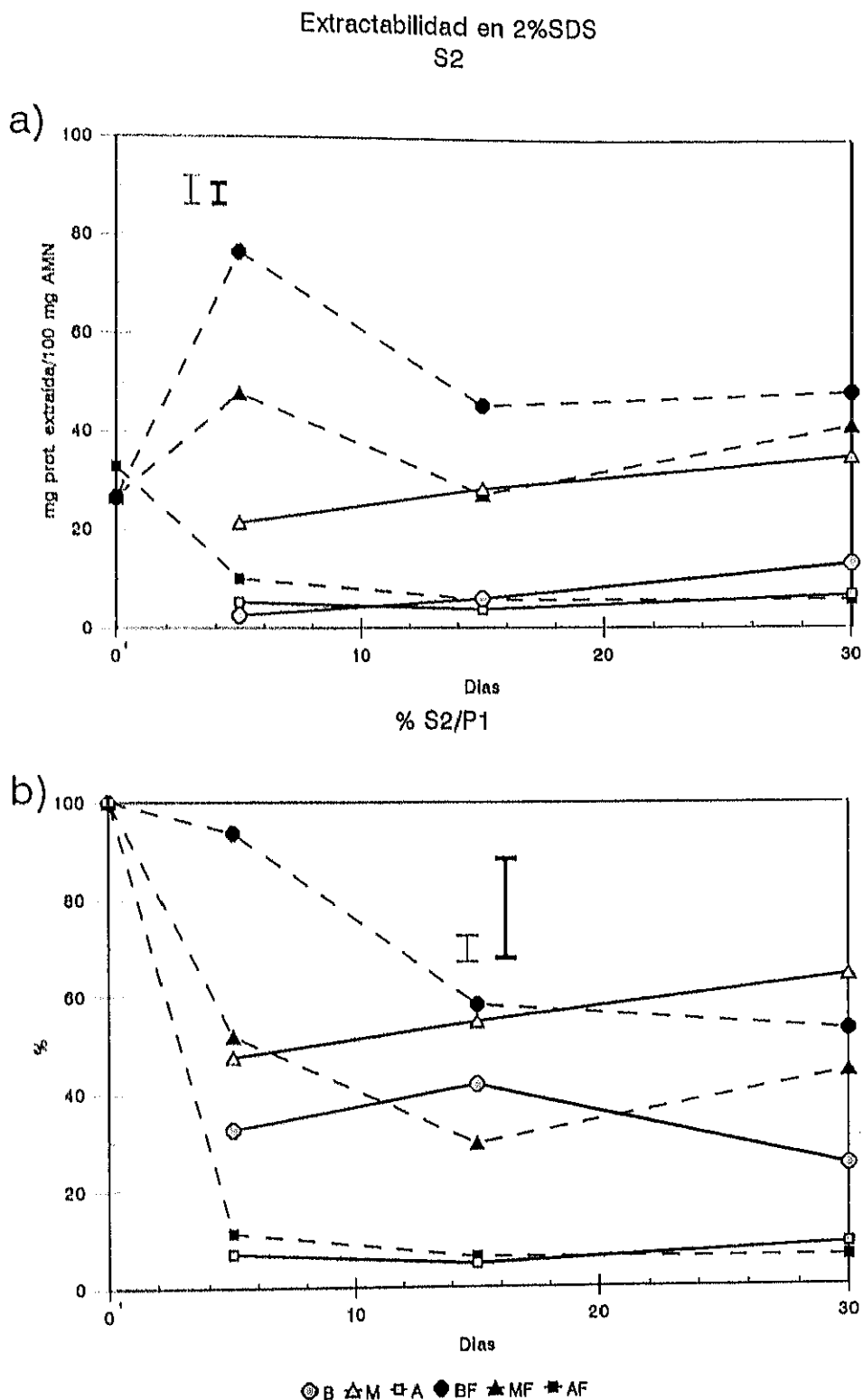


Figura 4.57.- Evolución de la extractabilidad en SDS 2% del agregado insoluble en NaCl 0,6 M (P1). a) expresada en mg prot. extraída por 100g de actomiosina natural (AMN); b) expresada en porcentaje de proteína extraída respecto a la proteína de P1. B, M, A: lotes testigos de bacalao, merluza y bacaladilla. B (FA), M (FA), A (FA): lotes con 6 mM de FA añadido. 0': control en fresco.

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde a los lotes con FA, la de trazo grueso a los lotes testigo.

de conservación. A los 30 días de conservación no se encontraron diferencias significativas entre los valores de solubilidad de bacalao y bacaladilla, aunque si las hubo entre estos y los de merluza, que fueron superiores al final de la conservación. En conclusión se puede decir que la naturaleza de P1 formado durante la congelación y conservación en congelación sin FA presente depende de la especie.

De forma general parece que en bacaladilla hubo mayor implicación de interacciones covalentes, seguida de merluza y bacalao. No hubo cambios significativos a lo largo del tiempo en ningún lote, aunque hubo interacción entre el efecto especie y el efecto tiempo (tabla 4.36.).

Cuando el FA se añadió sobre la proteína en fresco, el agregado (P1) formado inicialmente (que supuso un 30% aproximadamente en las tres especies) se solubilizó completamente cuando se trató con SDS 2% en las tres especies (figuras 4.57. a y b). Esto sugiere que en las tres especies la agregación inicial causada por la adición de FA sobre la proteína en fresco intervinieron las interacciones secundarias de manera importante.

El agregado P1 obtenido tras congelar la AMN con FA añadido (figura 4.57. a) se comportó de forma distinta en las tres especies. En bacalao, aunque no se pudo disolver completamente con SDS (figura 4.57. a), se extrajo un porcentaje muy alto de proteína (figura 4.57. b), decreciendo posteriormente tanto el porcentaje como el valor real. Una tendencia similar presentó el lote de merluza, pero tanto el valor real de la proteína solubilizada con SDS como el porcentaje de la misma respecto al agregado P1 fueron inferiores a lo observado en bacalao, indicando una mayor implicación en merluza respecto a bacalao de otros enlaces más fuertes que los secundarios. En bacaladilla se observó un descenso de la extractabilidad en SDS a los 5 días de conservación tanto en valor real como en porcentaje respecto al agregado P1, presentando a partir de dicho control valores constantes y mucho menores que los observados en merluza y bacalao. En general, los resultados obtenidos en las tres especies sugieren que en el agregado formado por la acción conjunta de la congelación y/o conservación en congelación y el FA existe una mayor implicación de enlaces covalentes (que dificultaron el acceso y la ruptura de las uniones secundarias) en bacaladilla, seguida de

merluza y de bacalao. Además, a lo largo de la conservación dicha implicación parece que aumenta en bacalao y merluza, mientras que en bacaladilla permanece estable.

Comparando el precipitado P1 formado durante la congelación o conservación en congelación en los lotes control con el formado en los lotes con FA, se pudo observar que los valores de extractabilidad en SDS fueron diferentes (tablas 4.38. y 4.39.), dependiendo de la especie (figura 4.57. a y b). Así, en bacalao, en el lote control (figura 4.57., B) se extrajo un menor porcentaje de proteína que en los lotes con FA añadido (BF). Esto significa que, en bacalao, la mayor insolubilización en NaCl 0,6 M observada en los lotes con FA (figura 4.56.) durante la congelación y conservación en congelación fue debida al establecimiento de enlaces secundarios fundamentalmente. Por otro lado, en bacaladilla, donde la pérdida de solubilidad en NaCl 0,6 M fue similar en los lotes control y con FA añadido, el porcentaje de P1 solubilizado con 2 % SDS fue también igual en ambos lotes. Esto indica que, en bacaladilla, independientemente de que se adicione o no FA, la participación de interacciones covalentes es la misma a lo largo de la conservación en congelación. En merluza, al igual que en bacaladilla, la implicación de las uniones covalentes en el agregado formado durante la congelación fue semejante en los lotes control y con FA añadido. Sin embargo al aumentar el tiempo de conservación hubo mayor participación de dichas uniones en el lote con FA (figura 4.57. b).

Estos resultados reflejan que, en cuanto a la implicación de uniones covalentes, la naturaleza de la agregación y el efecto del FA sobre esta dependió de la especie. En general, se observó mayor participación de estas interacciones en bacaladilla, seguida de merluza y de bacalao. El efecto más notable del FA sobre la agregación tuvo lugar en bacalao, donde, como ya se ha indicado, provocó un aumento de la agregación por formación de enlaces secundarios. También, en las tres especies se pudo observar que la agregación causada por el FA añadido en fresco fue de naturaleza secundaria.

#### 4.7.2.3.- Extractabilidad en SDS 2% + $\beta$ -ME 5% (S3) del agregado no extraído en SDS 2% (P2)

En la figuras 4.58. a y b se muestran los resultados de la proteína extraída al tratar con SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) los agregados insolubles en SDS 2% (P2) en las tres especies, expresados en valor real y en porcentaje respecto a P1 respectivamente. Las tablas 4.36. y 4.37. recogen los resultados de los correspondientes análisis de varianza de los datos anteriores en función del tiempo y la especie y las tablas 4.38. y 4.39. en función del tiempo y la adición de FA. El error estándar correspondiente a los análisis de varianza en función del tiempo y de la especie para los lotes control y con FA se muestra en las gráficas correspondientes en forma de barra.

Se observó un comportamiento diferente en las tres especies. En bacalao, el agregado no solubilizado con SDS 2% (P2) fue muy compacto y no se extrajo proteína en la fracción S3 tanto en el lote testigo como en el lote con FA añadido. En este caso no se puede descartar la formación de grupos S-S ya que estos podrían ser enmascarados por la formación de otros enlaces covalentes que no se rompen con este tratamiento.

En merluza, la cantidad de proteína extraída en S3 disminuyó a lo largo de la conservación más rápidamente que en bacaladilla, tanto en el lote testigo como en el lote con FA añadido (figura 4.58. a). Los valores en el lote con FA fueron superiores en merluza, pero no hubo diferencias significativas entre los lotes de bacaladilla (tabla 4.38.).

Si se considera la proteína extraída como porcentaje del agregado insoluble en NaCl 0,6 M (P1) (figura 4.58. b) los valores muestran que se extrajo inicialmente más proteína al romper enlaces disulfuro en merluza que en bacaladilla y más en el lote testigo que en el lote con FA, mientras que en bacaladilla no hubo diferencias iniciales entre los lotes testigo y con FA. Durante la conservación en congelación el porcentaje de proteína extraída disminuyó en todos los lotes, siendo esta tendencia más acentuada en merluza, de tal forma que los valores de esta especie fueron inferiores a los de bacaladilla al final de la conservación. En merluza, en el lote control la cantidad de proteína extraída en S3 en porcentaje del agregado inicial P1



Extractabilidad en 2%SDS+5%ME  
S3

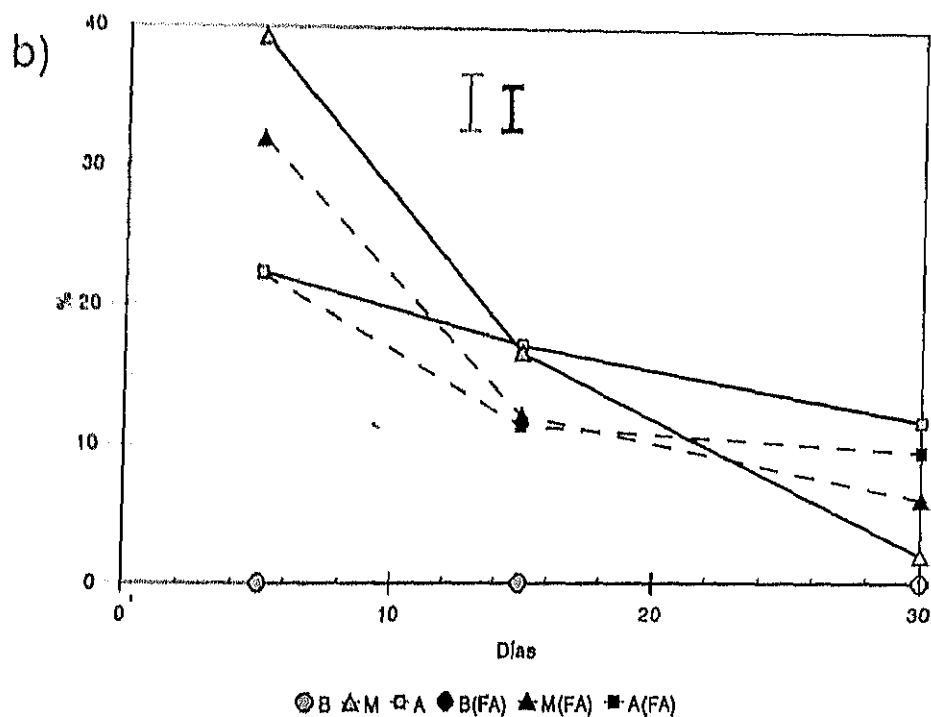
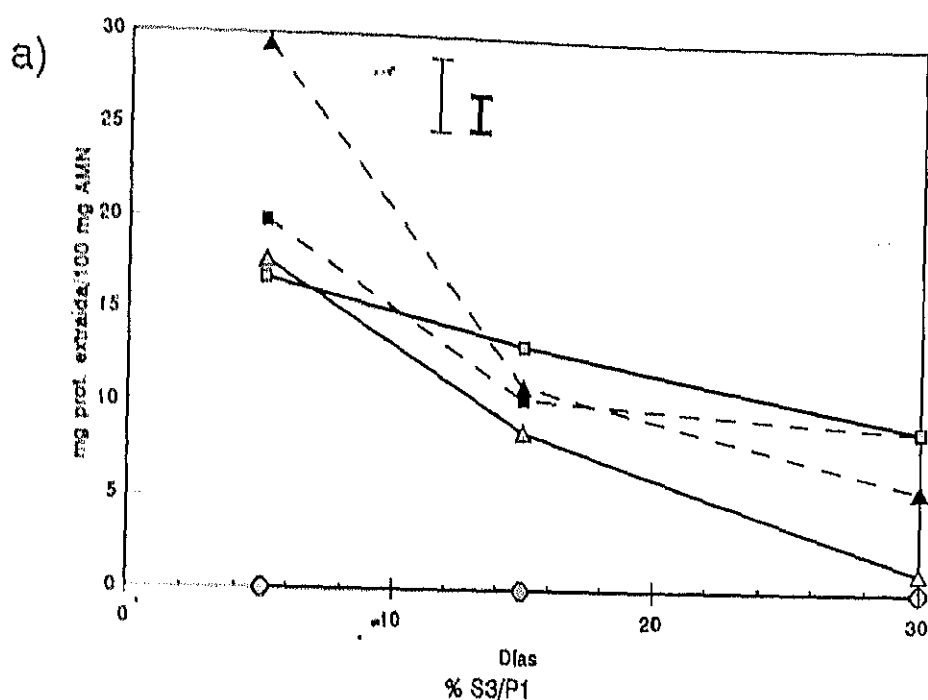


Figura 4.58.- Evolución de la extractabilidad en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) del agregado insoluble en NaCl 0,6 M (P1). a) expresada en mg prot. extraída por 100g de actomiosina natural (AMN); b) expresada en porcentaje de proteína extraída respecto a la proteína de P1. B, M, A: lotes testigos de bacalao, merluza y bacaladilla. B (FA), M (FA), A (FA): lotes con 6 mM de FA añadido. 0': control en fresco.

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde a los lotes con FA, la de trazo grueso a los lotes testigo.

fue superior al lote con FA. En bacaladilla el control dió valores inicialmente iguales y posteriormente mayores que el lote con FA.

Con los resultados presentados hasta ahora no se puede inferir nada tanto acerca de la participación de los enlaces S-S como del efecto del FA sobre esta, porque la formación de otro tipo de enlaces covalentes podría impedir el acceso a los grupos S-S por el  $\beta$ -ME. Más adelante se considerarán los cambios en las distintas fracciones en cada lote por separado y se discutirá, cuando sea posible, la participación de estos enlaces.

#### 4.7.2.4.- Proteína no extraída con el tratamiento aplicado (P3)

El agregado no extraído con el tratamiento aplicado (P3) que se formó en las tres especies se muestra en la figura 4.59 a. Esta fue siempre mayor en los lotes con FA que en los testigo en las tres especies. Este efecto fue mayor en merluza que en bacalao y bacaladilla. En bacaladilla se observaron los mayores valores tanto en el lote testigo como con FA. La cantidad de P3 aumentó con el tiempo de conservación en los lotes con FA, sin embargo no cambió en los lotes testigo excepto en bacalao.

Los valores de P3 expresados en porcentaje de P1 ( $\% P3/P1$ ) se pueden observar en la figura 4.59. b). El efecto de la adición de FA fue distinto en las tres especies. Así, mientras que en merluza provocó un aumento en la participación de enlaces covalentes, en bacalao el efecto fue el contrario. En bacaladilla el FA no causó efecto alguno en cuanto a la participación de enlaces covalentes no S-S en la agregación.

Si comparamos los valores de P3/P1 observados en las tres especies, en los lotes testigo estos fueron superiores en bacalao y bacaladilla que en merluza, indicando que la participación de enlaces covalentes fue superior en ambas especies cuando no se añade FA. Sin embargo, en presencia de FA, la bacaladilla presentó mayor participación de enlaces covalentes no S-S que las otras dos especies.

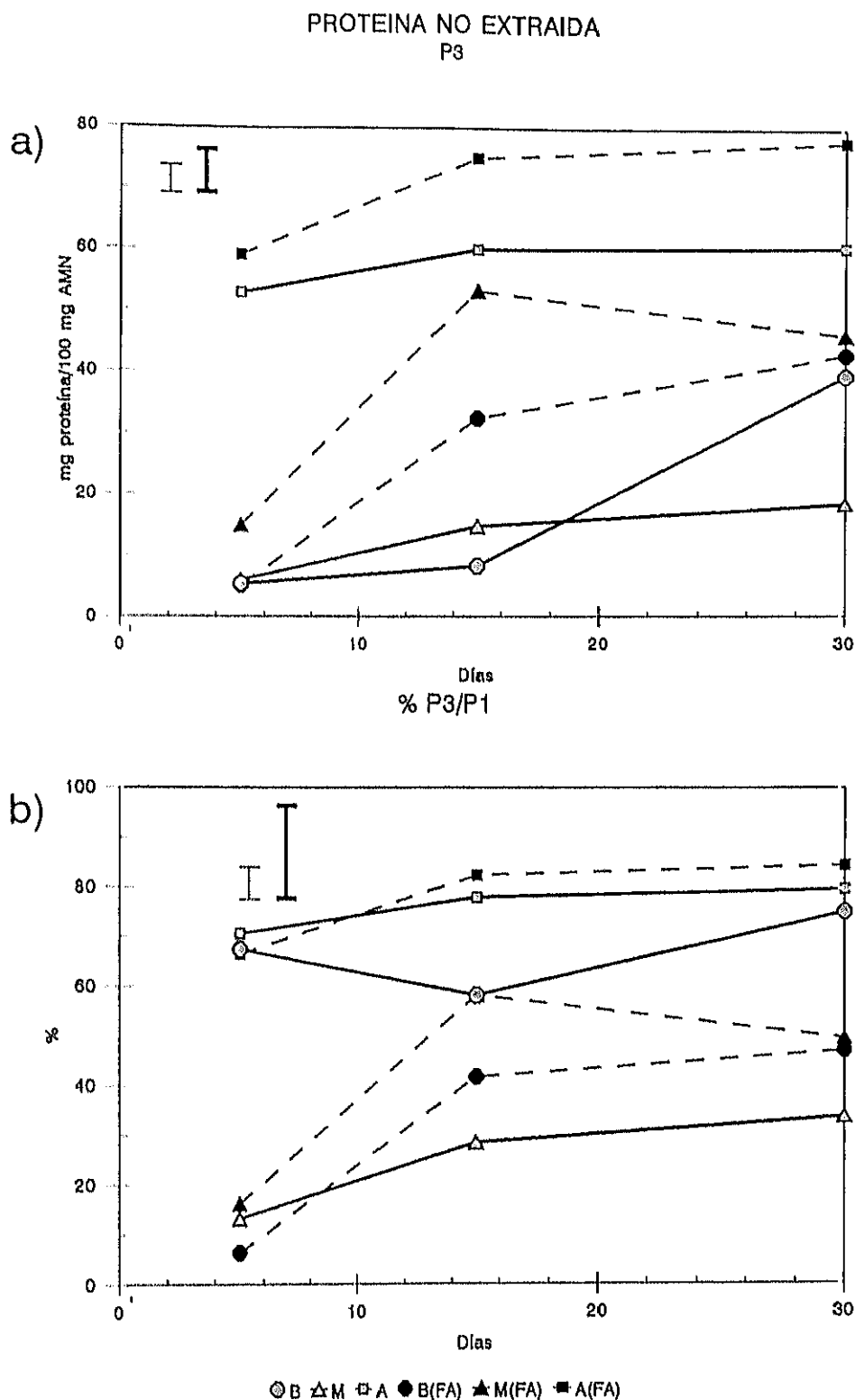


Figura 4.59.- Evolución del agregado insoluble en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (P3). a) expresada en mg prot. extraída por 100g de actomiosina natural (AMN); b) expresada en porcentaje de proteína extraída respecto a la proteína de P1. B, M, A: lotes testigos de bacalao, merluza y bacaladilla. B (FA), M (FA), A (FA): lotes con 6 mM de Fa añadido. 0': control en fresco.

Las barras verticales indican el intervalo de confianza al 95%. La de trazo fino corresponde a los lotes con FA, la de trazo grueso a los lotes testigo.

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
S1 (T)	***	***	***
S2 (T)	***	***	***
S3 (T)	***	***	***
P3 (T)	***	***	***
S1 (F)	***	***	***
S2 (F)	***	***	***
S3 (F)	***	*	***
P3 (F)	***	***	***

Tabla 4.36.- Análisis de la varianza correspondiente a la medida de la cantidad de proteína presente en las fracciones S1 (NaCl 0,6 M), S2 (SDS 2%), S3 (SDS 2%+ ME 5%) y P3 (agregado no extraído por el tratamiento aplicado), obtenidas de la actomiosina natural (AMN) de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) (merluza y bacaladilla solamente, en el caso de S3) conservada en congelación (-20°C) durante 30 días en los lotes testigo (S1, S2 y S3) y con 6mM de formaldehído (FA) añadido (S1F, S2F y S3F), en función del tiempo de conservación y de la especie estudiada.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y de la especie.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

	TIEMPO	ESPECIE	TIEMPO x ESPECIE
S2/P1 (T)	-	***	*
S3/P1 (T)	***	**	***
P3/P1 (T)	-	***	-
S2/P1 (F)	***	***	***
S3/P1 (F)	***	*	***
P3/P1 (F)	***	***	***

Tabla 4.37.- Análisis de la varianza correspondiente al porcentaje respecto a P1 (agregado insoluble en NaCl 0,6 M) de proteína presente en las fracciones S2 (SDS 2%), S3 (SDS 2%+ ME 5%) y P3 (agregado proteico no extraído con el tratamiento aplicado), obtenidas de la actomiosina natural (AMN) de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) (merluza y bacaladilla solamente, en el caso de S3) conservada en congelación (-20°C) durante 30 días en los lotes testigo (T) y con 6mM de formaldehído (FA) añadido (F), en función del tiempo de conservación y de la especie estudiada.

TIEMPO x ESPECIE = Interacción entre el efecto del tiempo y de la especie.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

	TIEMPO	FA	TIEMPO x FA
S1 (B)	***	***	***
S2 (B)	***	***	***
P3 (B)	***	***	***
S1 (M)	***	***	*
S2 (M)	**	***	***
S3 (M)	***	***	***
P3 (M)	***	***	***
S1 (A)	***	***	***
S2 (A)	***	***	***
S3 (A)	*	-	-
P3 (A)	***	***	***

Tabla 4.38.- Análisis de la varianza correspondiente a la cantidad de proteína presente en las fracciones S1 (NaCl 0,6 M), S2 (SDS 2%), S3 (SDS 2%+ ME 5%) y P3 (agregado no extraído por el tratamiento aplicado), obtenidas de la actomiosina natural (AMN) de bacalao (B), merluza (M) y bacaladilla (A) conservada en congelación (-20°C) durante 30 días en función de la adición de 6mM de formaldehído (FA) y del tiempo de conservación.

TIEMPO x FA = Interacción entre el efecto del tiempo y de la adición de 6mM FA.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$ ,

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$ ,

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

	TIEMPO	FA	TIEMPO x FA
S2/P1 (B)	*	***	**
P3/P1 (B)	*	***	**
S2/P1 (M)	*	**	**
S3/P1 (M)	***	*	***
P3/P1 (M)	***	***	*
S2/P1 (A)	***	**	***
S3/P1 (A)	***	**	*
P3/P1 (A)	***	*	***

Tabla 4.39.- Análisis de la varianza correspondiente al porcentaje respecto a P1 (agregado proteico insoluble en NaCl 0,6 M) de proteína presente en las fracciones S2 (SDS 2%), S3 (SDS 2% + ME 5%) y P3 (agregado no extraído por el tratamiento aplicado), obtenidas de la actomiosina natural (AMN) de bacalao (B), merluza (M) y bacaldilla (A) conservada en congelación (-20°C) durante 30 días en función de la adición de 6mM de formaldehído (FA) y del tiempo de conservación.

TIEMPO x FA = Interacción entre el efecto del tiempo y de la adición de 6mM FA.

\*\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.001$

\*\* = Efecto significativo a  $P < 0.01$

\* = Efecto significativo a  $P < 0.05$

- = Efecto no significativo

En cuanto a los cambios a lo largo del tiempo, en los lotes control estos no fueron significativos. Los lotes con FA añadido, sin embargo, presentaron una tendencia hacia el aumento en la proporción de enlaces covalentes no S-S en la agregación.

#### 4.7.2.5.- Naturaleza de la agregación a lo largo de la conservación

Como ya se ha indicado, en este sistema modelo también se estudia separadamente en cada lote la evolución en los cambios en solubilidad y extractabilidad del agregado insoluble. Con ello se pretendía obtener una visión general de la naturaleza de la agregación y sus cambios a lo largo del tiempo en cada lote.

En las figuras 4.60. a 4.63. se muestran los resultados del estudio de solubilidad para cada una de las especies. En cada figura se representa la AMN soluble en NaCl 0,6 M (S1) e insoluble en NaCl 0,6 M (P1) y el porcentaje del agregado insoluble en sal (P1) extraído en SDS 2% (S2) y en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) y no extraído (P3).

En la figura 4.60. se muestran los resultados en el lote testigo de AMN de bacalao (B). En ella se observa que hubo un aumento gradual de la cantidad de agregado formado durante la conservación, sin embargo la naturaleza de los enlaces implicados en dicha agregación no cambió. En esta intervinieron en gran proporción los enlaces covalentes puesto que una gran parte del agregado no pudo solubilizarse en las condiciones empleadas. No se detectó proteína extraída en S3, lo cual podría ser debido a que la formación de enlaces covalentes no S-S los enmascara.

En la figura 4.61. se muestran los resultados para el lote de AMN de bacalao con FA añadido (BF). En este se observa que hubo una formación de agregado por efecto de la congelación mucho mayor que lo observado en filetes, sin embargo la cantidad no cambió a lo largo de la conservación. Por otro lado, la naturaleza del agregado cambió a lo largo de la conservación, de tal manera que se observó un aumento en la proporción de P3 y por tanto de participación de enlaces covalentes en el agregado. Este aumento fue el causante del



# AMN AISLADA (SM2) SOLUBILIDAD Y EXTRACTABILIDAD

B

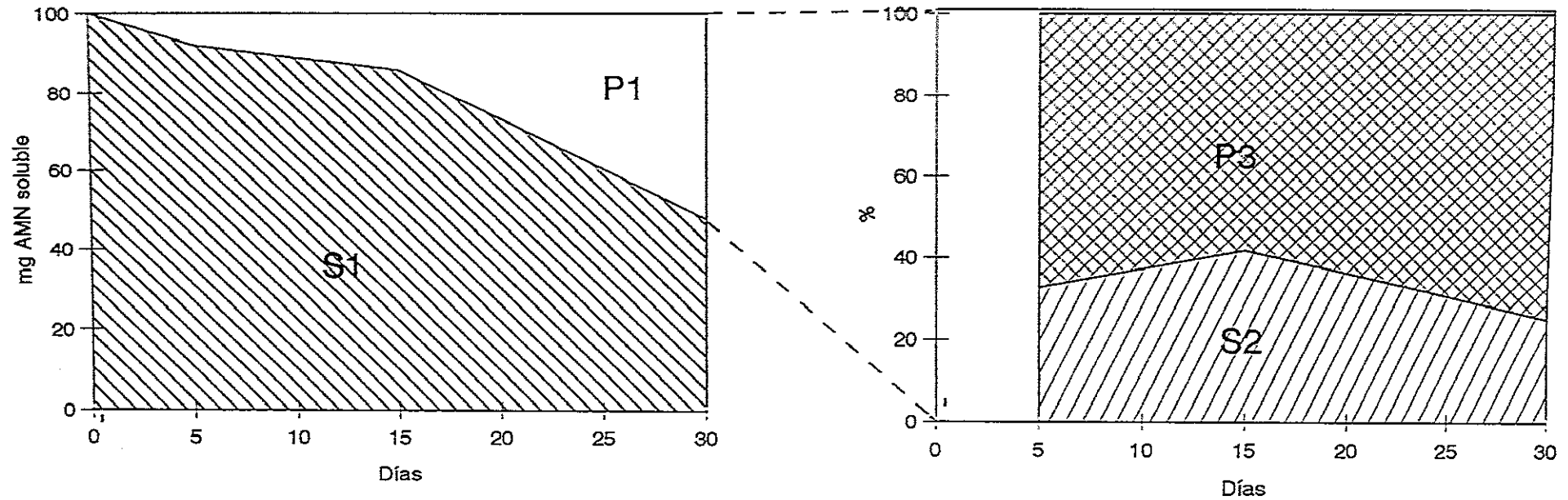


Figura 4.60.- Actomiosina natural (AMN) de bacalao (B) conservada en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$   
a: Proteína soluble e insoluble en  $\text{NaCl}$  0,6 M (S1 y P1 respectivamente) (g de proteína extraída/100g de AMN)  
b: Extractabilidad de P1. Porcentaje de proteína extraída en SDS 2% (S2) y no extraída (P3)  
0': control en fresco.

# AMN AISLADA (SM2) SOLUBILIDAD Y EXTRACTABILIDAD

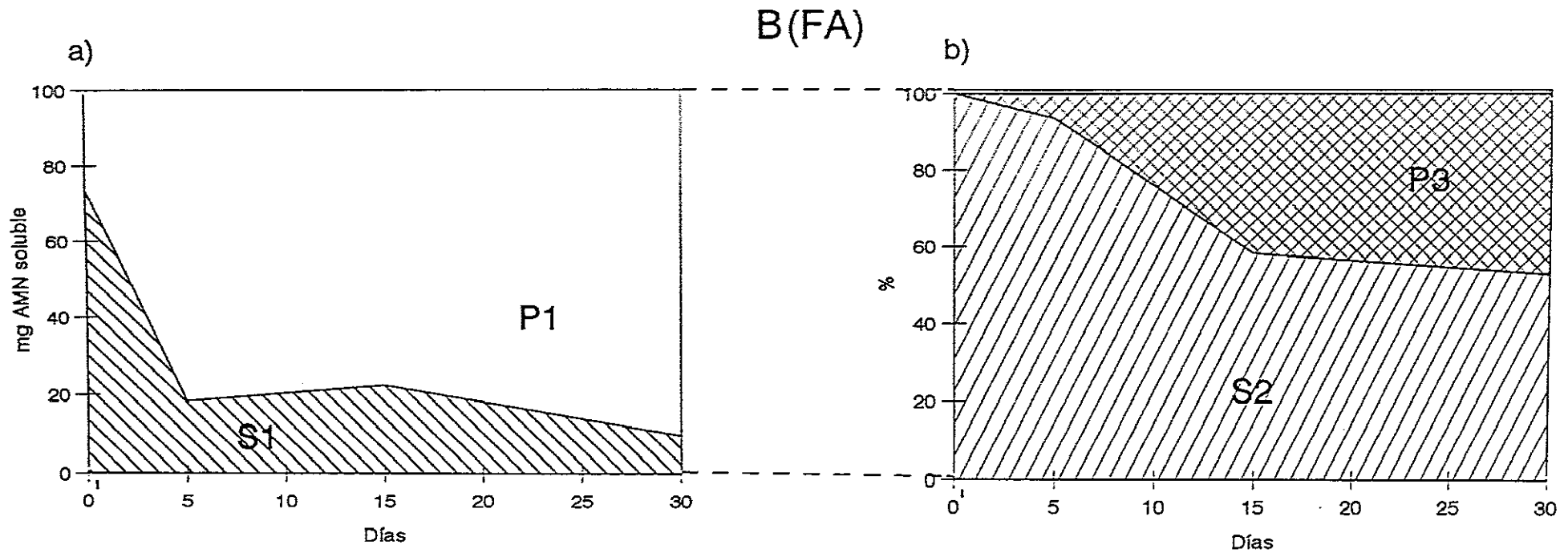


Figura 4.61.- Actomiosina natural (AMN) de bacalao conservada en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  con FA 6 mM añadido (B (FA))

a: Proteína soluble e insoluble en NaCl 0,6 M (S1 y P1 respectivamente) (g de proteína extraída/100g de AMN)

b: Extractabilidad de P1. Porcentaje de proteína extraída en SDS 2% (S2) y no extraída (P3)

0': control en fresco.

# AMN AISLADA (SM2) SOLUBILIDAD Y EXTRACTABILIDAD

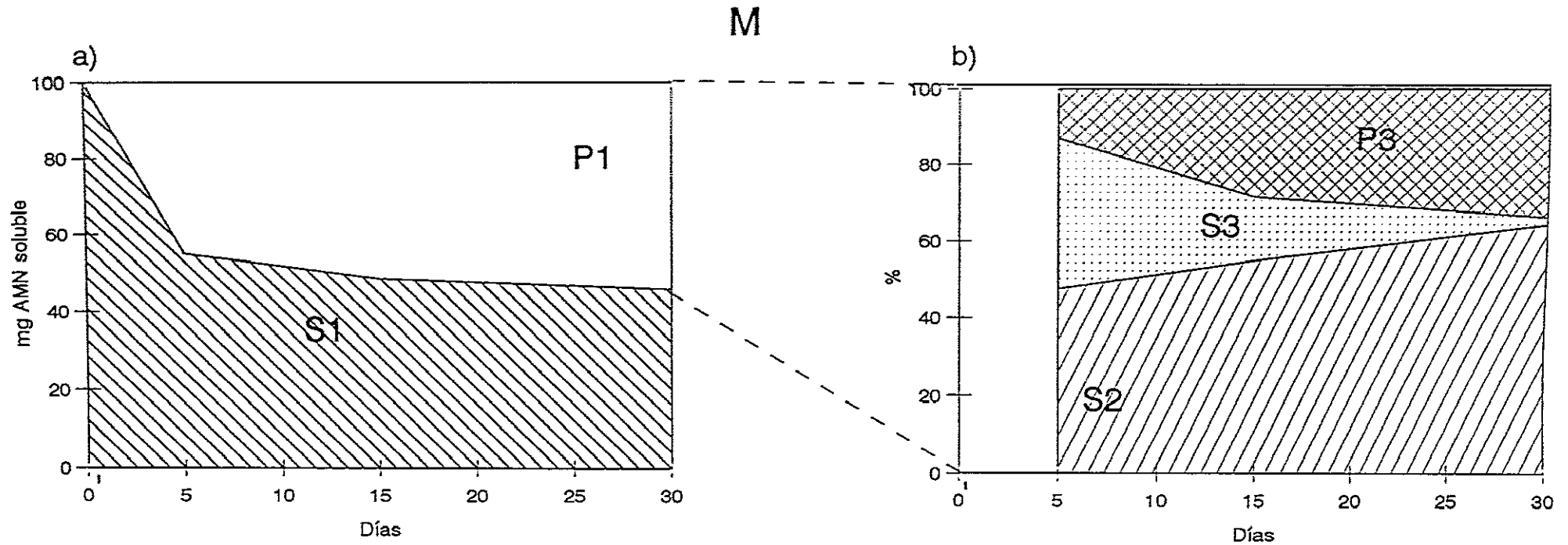


Figura 4.62.- Actomiosina natural (AMN) de merluza (M) conservada en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$   
a: Proteína soluble e insoluble en NaCl 0,6 M (S1 y P1 respectivamente) (g de proteína extraída/100g de AMN)  
b: Extractabilidad de P1. Porcentaje de proteína extraída en SDS 2% (S2), SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) y no extraída (P3)  
0': control en fresco.

# AMN AISLADA (SM2) SOLUBILIDAD Y EXTRACTABILIDAD M(FA)

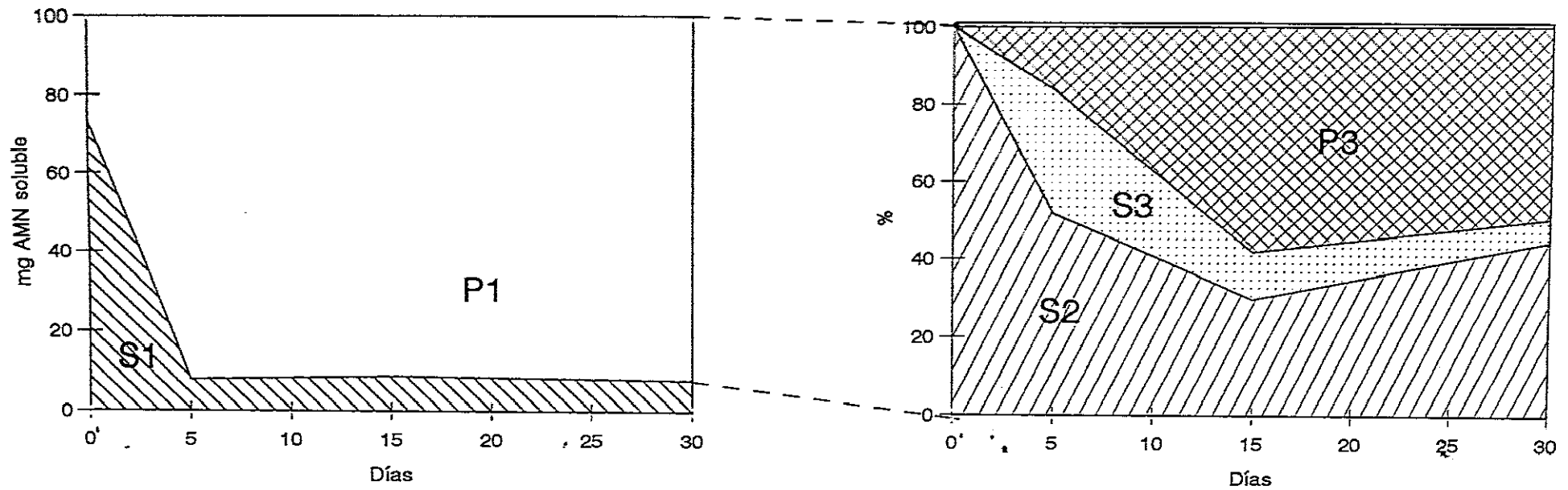


Figura 4.63.- Actomiosina natural (AMN) de merluza conservada en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  con FA 6 mM añadido (M (FA))

a: Proteína soluble e insoluble en NaCl 0,6 M (S1 y P1 respectivamente) (g de proteína extraída/100g de AMN)

b: Extractabilidad de P1. Porcentaje de proteína extraída en SDS 2% (S2), SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) y no extraída (P3).

0': control en fresco.

descenso observado en la proporción de la fracción S2, o proteína extraída mediante la ruptura de enlaces secundarios con SDS 2%. En este lote tampoco se detectó proteína extraída en S3, lo cual podría explicarse por la misma razón que se indicó en el lote anterior.

De la comparación de los dos lotes de AMN de bacalao (testigo y con FA añadido) se puede deducir que el FA produjo una mayor agregación. Sin embargo esta diferencia en cantidad de agregado formado fue debida sobre todo al establecimiento de uniones secundarias. Por lo tanto la acción del FA se manifestó tanto en cambios en cantidad de agregación como en proporción de los enlaces implicados en la misma.

En la figura 4.62. se observan los datos obtenidos en el lote testigo de AMN de merluza. En este caso, la cantidad de agregado formado inicialmente fue mayor que en bacalao y se mantuvo constante a lo largo de la conservación. Sin embargo la proporción de los enlaces implicados cambió al aumentar el tiempo de conservación. Se observó un aumento en la proporción de P3 y por tanto de enlaces covalentes implicados. Este aumento fue acompañado de un descenso en la proporción de la fracción S3, lo cual podría ser debido a que los enlaces S-S no son detectados debido a la mayor presencia de enlaces covalentes (como ya se ha indicado en bacalao). En cuanto a la fracción S2, se observó un aumento, pero, como ya se ha indicado cuando se estudiaron los cambios en los distintos lotes en dicha fracción, este no fue significativo.

En la figura 4.63. se muestran los datos relativos al lote de AMN de merluza con FA añadido. Se puede observar que hubo una formación de agregado mayor que en el lote testigo aunque la cantidad del mismo no cambió a lo largo de la conservación. A pesar de ello, si hubo cambios en cuanto a la proporción de los distintos enlaces implicados, ya que se observó un aumento importante en la fracción P3 acompañado de un descenso en las fracciones S3 y S2. Así, aunque inicialmente se pudo extraer todo el agregado rompiendo enlaces secundarios (con SDS 2%), a lo largo de la conservación este se mostró cada vez menos extraíble por el tratamiento aplicado, debido a la formación de mayor número enlaces covalentes.

Por tanto, en merluza, la adición de FA provocó la agregación de la proteína en fresco

# AMN AISLADA (SM2) SOLUBILIDAD Y EXTRACTABILIDAD

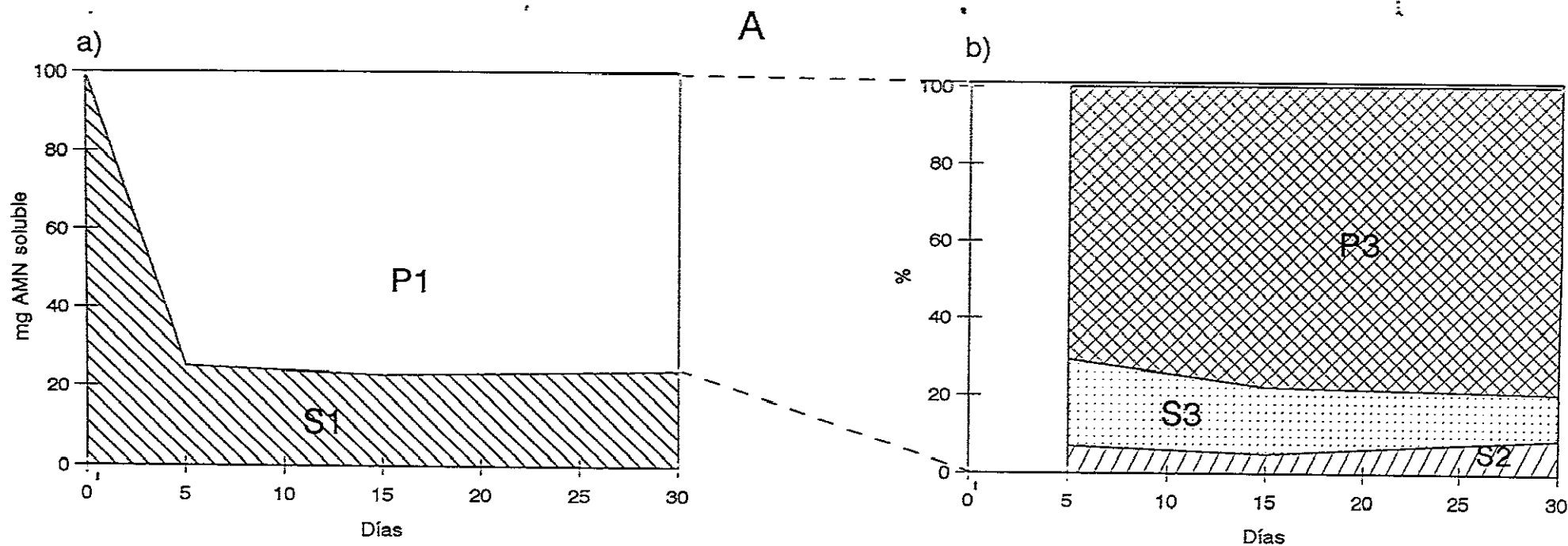


Figura 4.64.- Actomiosina natural (AMN) de bacaladilla (A) conservada en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$   
a: Proteína soluble e insoluble en NaCl 0,6 M (S1 y P1 respectivamente) (g de proteína extraída/100g de AMN)  
b: Extractabilidad de P1. Porcentaje de proteína extraída en SDS 2% (S2), SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) y no extraída (P3)  
0': control en fresco.

# AMN AISLADA (SM2) SOLUBILIDAD Y EXTRACTABILIDAD A(FA)

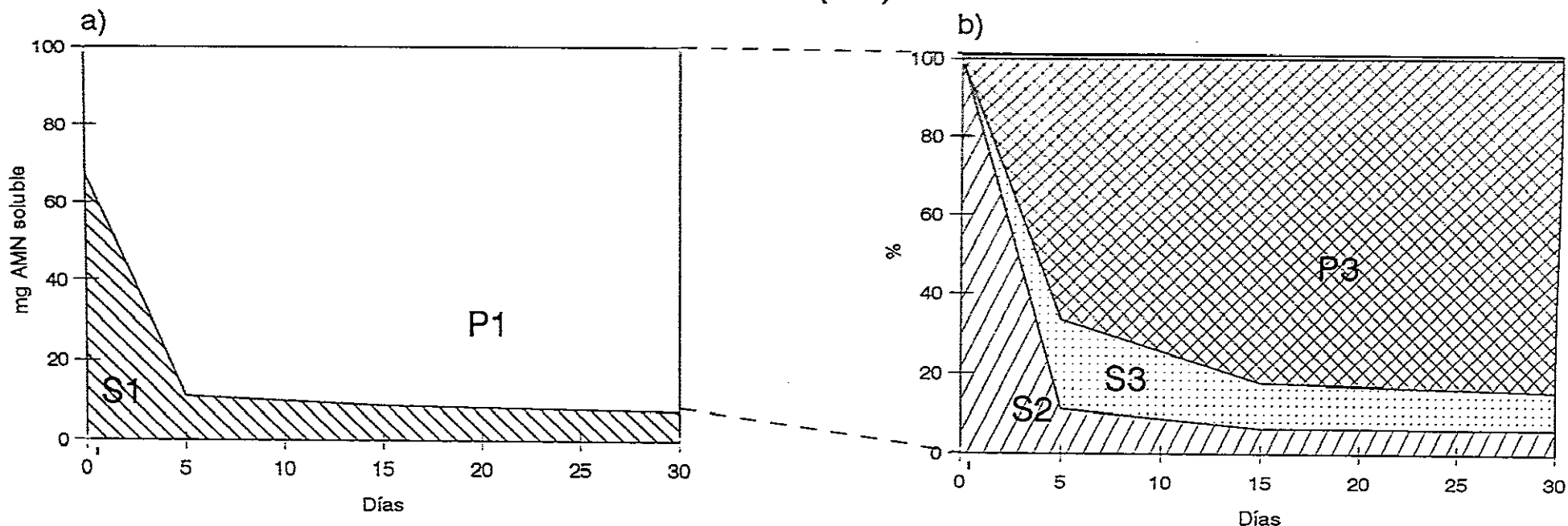


Figura 4.65.- Actomiosina natural (AMN) de bacaladilla conservada en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  con FA 6 mM añadido (A (FA))  
a: Proteína soluble e insoluble en NaCl 0,6 M (S1 y P1 respectivamente) (g de proteína extraída/100g de AMN)  
b: Extractabilidad de P1. Porcentaje de proteína extraída en SDS 2% (S2), SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) y no extraída (P3)  
0': control en fresco.

(tiempo 0) fundamentalmente por interacciones secundarias. Sin embargo, al aumentar el tiempo de conservación, el porcentaje de proteína extraída al romper enlaces secundarios fue menor en presencia de FA debido a la formación de mayor proporción de uniones covalentes no S-S.

En el lote testigo de bacaladilla (figura 4.64.) los resultados indican que la agregación observada fue mayor y con mayor implicación de enlaces covalentes no S-S que en bacalao y merluza. Mientras que porcentaje de agregado no extraído fue mayor en esta especie, la proporción de la fracción de proteína extraída al romper enlaces secundarios con SDS 2% (S2) fue menor. No se detectaron cambios a lo largo de la conservación ni en cantidad ni en proporción de los enlaces implicados en la agregación.

En bacaladilla, al igual que en merluza y bacalao (figuras 4.61. y 4.63.), la adición de FA provocó agregación de la proteína en fresco (0') por enlaces secundarios fundamentalmente (figura 4.65.). Posteriormente, la proporción de las distintas fracciones obtenidas fue similar que en el lote testigo (figura 4.64.) y tampoco cambió a lo largo del tiempo de conservación, aunque la cantidad de agregado formada debido a la acción del FA fue mayor.

En bacaladilla, por tanto, el FA actuó aumentando la cantidad de agregado formado, pero no en la proporción de enlaces implicados en esta agregación. Las cantidades de agregado insoluble en sal (P1) fueron más altas y parecidas en ambos lotes de esta especie en comparación con lo observado en las otras. Esto, unido a los resultados obtenidos en extractabilidad del agregado parece sugerir que cuando la proteína está más desnaturalizada la acción del FA tanto en cantidad de agregación como en naturaleza de los enlaces implicados en la misma es menos evidente.



#### 4.7.2.6.– Electroforesis SDS–PAGE

##### Cambios electroforéticos en la AMN extraída con NaCl 0,6 M (S1)

Los perfiles electroforéticos de las fracciones solubles en NaCl 0,6 M de los lotes testigo de bacalao (figuras 4.66.) y merluza (figuras 4.67.) no se alteraron durante la conservación en congelación, mientras que en los de bacaladilla (figuras 4.68.) la proporción de banda de CPM en el densitograma disminuyó, incrementando la de las bandas de PM inferior a la Ac. Una tendencia similar se observó en el SM1 en bacaladilla (figuras 4.53., 4.54. y 4.55.). Sin embargo los cambios fueron menos acentuados en el SM1 que en el presente estudio, al igual que lo fue la caída de solubilidad (figuras 4.49. y 4.56.).

La adición de FA a las muestras en fresco provocó en las tres especies un aumento en la intensidad del pico 1 (figuras 4.66., 4.67. y 4.68.), indicando la presencia de agregados covalentes, esto coincide con lo obtenido en merluza en el SM1 (figuras 4.50. a y b).

En todos los lotes, cuando las muestras con FA fueron congeladas, la banda de la CPM disminuyó mientras que aumentó el porcentaje de las bandas de PM inferior a la Ac. Este efecto fue más aparente al final del periodo de conservación. También se observó una disminución del pico 1, poniendo de manifiesto el aumento de tamaño de los agregados de naturaleza covalente al aumentar el tiempo de conservación.

En bacaladilla se apreciaron cambios parecidos por efecto de la congelación y conservación en congelación con FA en el SM1, aunque fueron menos acentuados. Esto podría relacionarse con la menor insolubilización detectada en esta especie en SM1 a la misma proporción proteína/FA (figuras 4.49., F2 y 4.56., AFA).

En bacalao también se apreciaron estos cambios en SM1 por efecto de la conservación en congelación con FA (figura 4.55., F2 ). Sin embargo, la congelación no produjo cambios en el perfil (figura 4.54., F2 ). Esto podría relacionarse también con la menor insolubilización

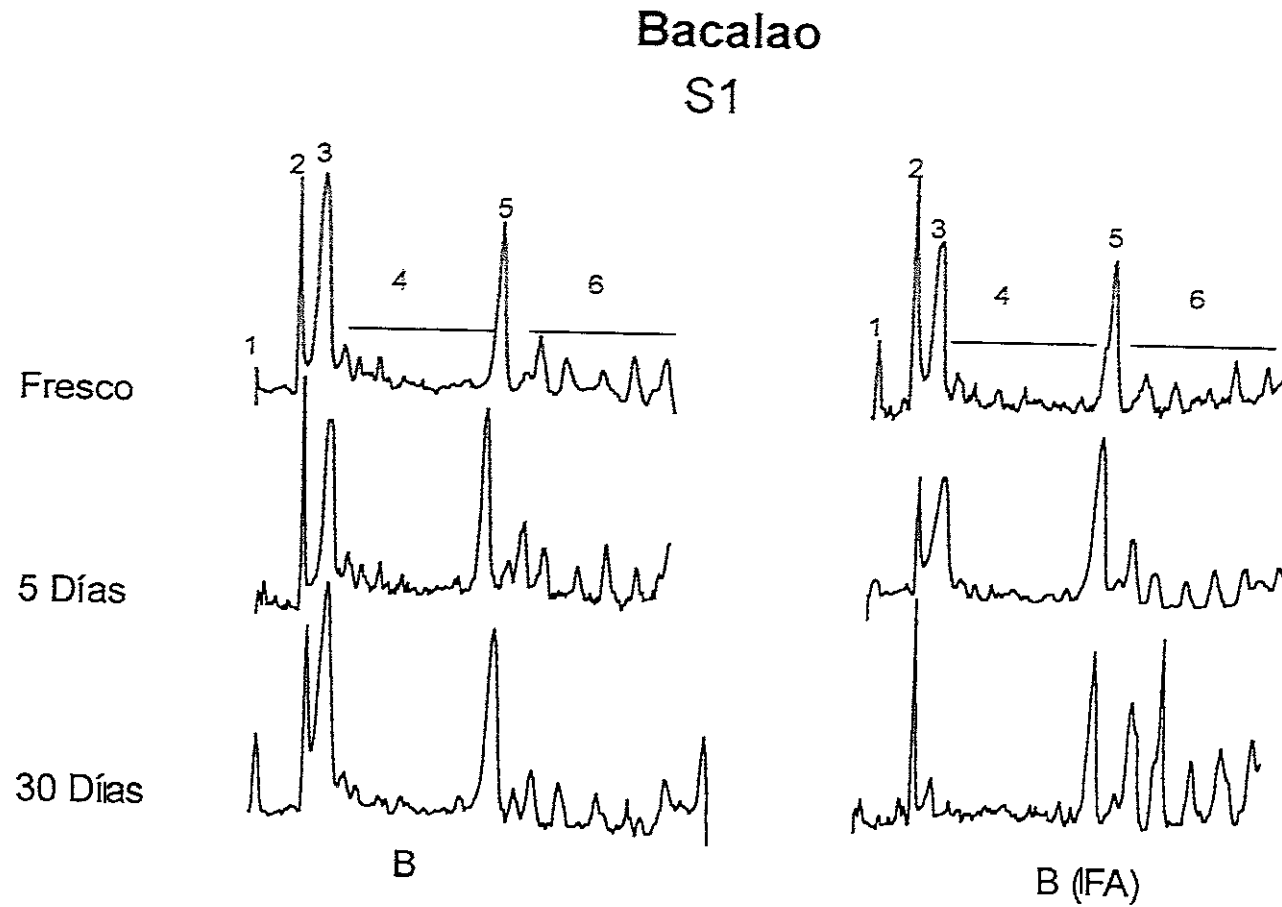


Figura 4.66.— Perfiles electroforéticos de la actomiosina natural (AMN) de bacalao soluble en NaCl 0,6 M en fresco (0') y a los 5 y 30 días de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Geles al 12,5%. B: lote testigo y B (FA): lote con 6 mM de formaldehído (FA). Picos identificados en apartado 4.2.1.

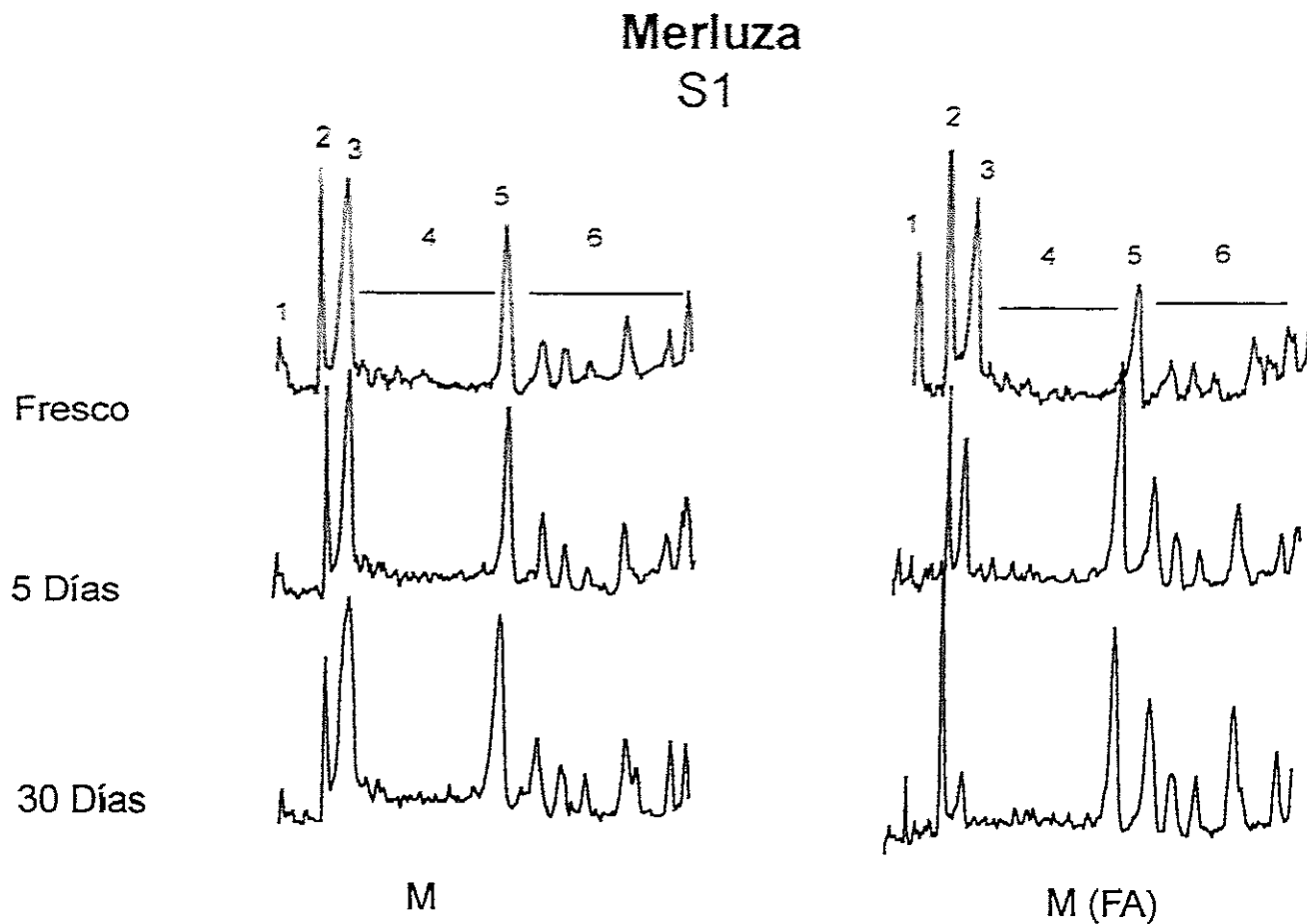


Figura 4.67.– Perfiles electroforéticos de la actomiosina natural de merluza (AMN) soluble en NaCl 0,6 M en fresco (0') y a los 5 y 30 días de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Geles al 12,5%. M: lote testigo y M (FA): lote con 6 mM de formaldehído (FA). Picos identificados en apartado 4.2.1.

## Bacaladilla S1

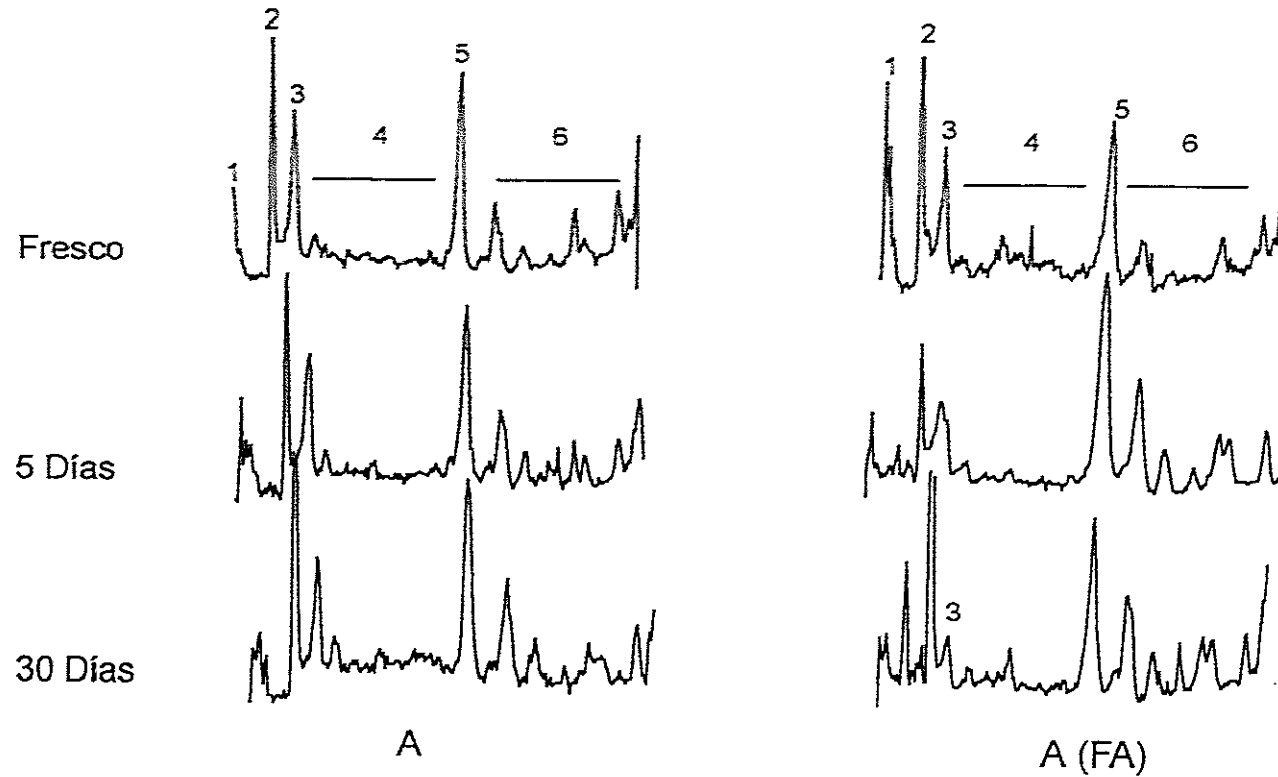


Figura 4.68.- Perfiles electroforéticos de la actomiosina natural (AMN) de bacaladilla soluble en NaCl 0,6 M en fresco (0') y a los 5 y 30 días de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Geles al 12,5%. A: lote testigo y A (FA): lote con 6 mM de formaldehído (FA). Picos identificados en apartado 4.2.1.

observada en S1 (figura 4.48., F2 y 4.56., BFA) y que pudiera atribuirse a que el daño causado por el FA se incrementa cuando la concentración del mismo y de la proteína son mayores.

#### Cambios electroforéticos en la proteína extraída con SDS 2% (S2)

Los perfiles de las fracciones extraídas del agregado P1 al romper enlaces secundarios con SDS 2% (S2) de los lotes testigo y con 6mM de FA añadido en las tres especies lotes se representan en las figuras 4.69. a 4.71.

Las proteínas mayoritarias, al igual que en S1, fueron CPM y Ac. En bacalao (figura 4.69.) y merluza (figura 4.70.) se observó en general una mayor proporción de CPM que la detectada en la muestra de S1 correspondiente al fresco. Esto se explica por el enriquecimiento en CPM del agregado P1, debido a la mayor insolubilización observada en dicha proteína en S1. En bacaladilla (figura 4.71.), a pesar de que también se detectó una disminución importante en la proporción de CPM en el S1, no se observó la presencia de una mayor proporción en S2, indicando que el P2 en esta especie está enriqueciéndose en CPM debido a una mayor implicación de dicha proteína en la formación de enlaces covalentes. Esto fue más evidente en los lotes con FA.

En cuanto a la acción del FA sobre la composición de la proteína extraída en esta fracción, los perfiles electroforéticos muestran que esta fue diferente según la especie. Así, en bacalao (figura 4.69.) se observó un incremento de proteína en el pico 1, indicando que en la fracción S2 se extraen agregados covalentes que se han formado por la acción del FA añadido. En merluza (figura 4.70.) se observó un aumento del pico 1 más dramático en el lote con FA tras 30 días de conservación. Este aumento del pico 1 se acompañó de una disminución en la intensidad del pico de CPM. Matthews y col. (1979) observaron un efecto similar durante la conservación por congelación de músculo de bacalao. Lim y Haard (1984) observaron en hipogloso negro la presencia de esta banda de PM elevado al tratar con SDS el precipitado insoluble en sal obtenido durante la conservación en congelación. En bacaladilla (figura 4.71.)

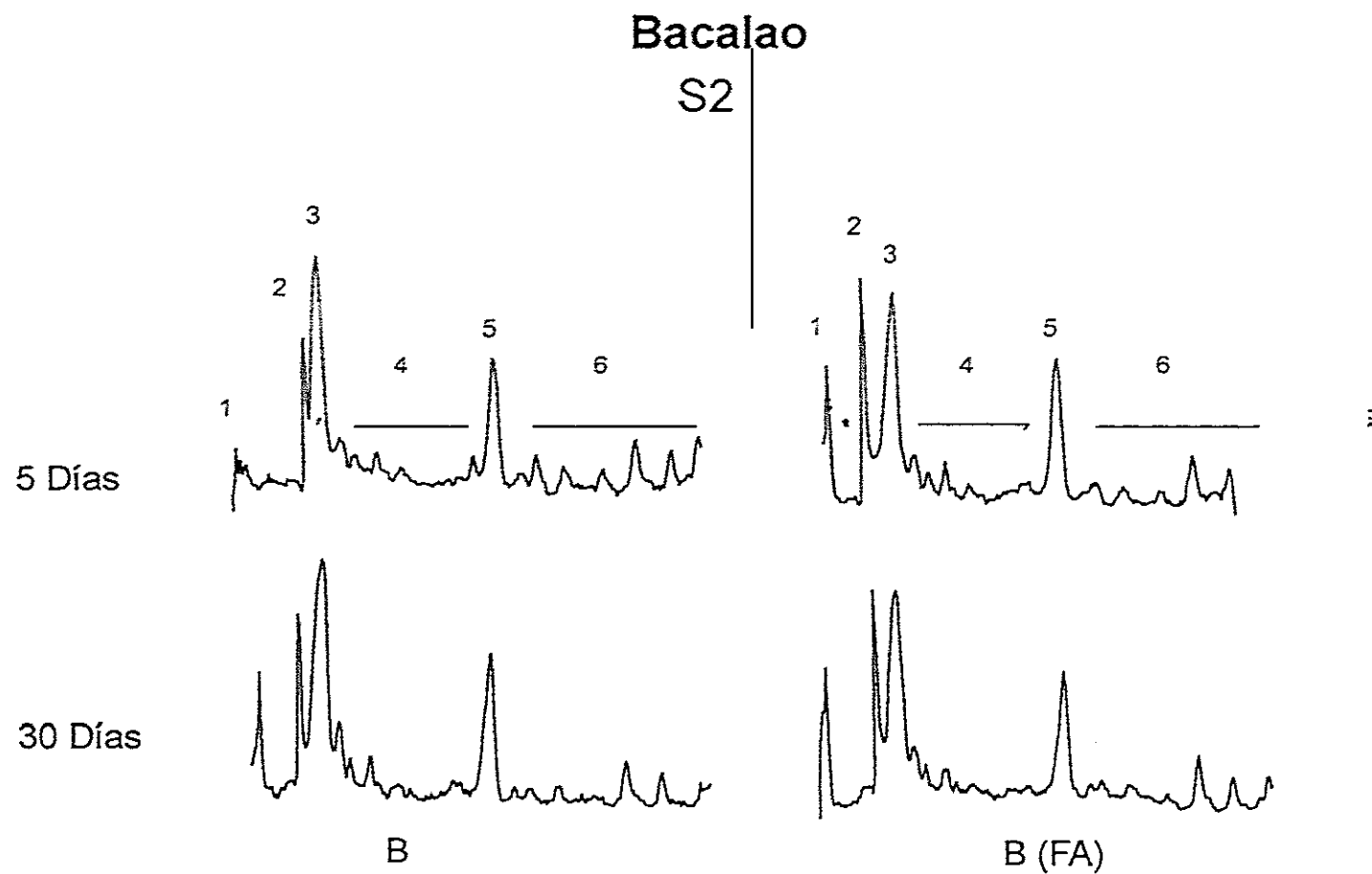


Figura 4.69.– Perfiles electroforéticos de proteína de bacalao extraída en SDS 2% (S2) a los 5 y 30 días de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Geles al 12,5%. B: lote testigo y B (FA): lote con 6 mM de formaldehído (FA). Picos identificados en apartado 4.4.1.

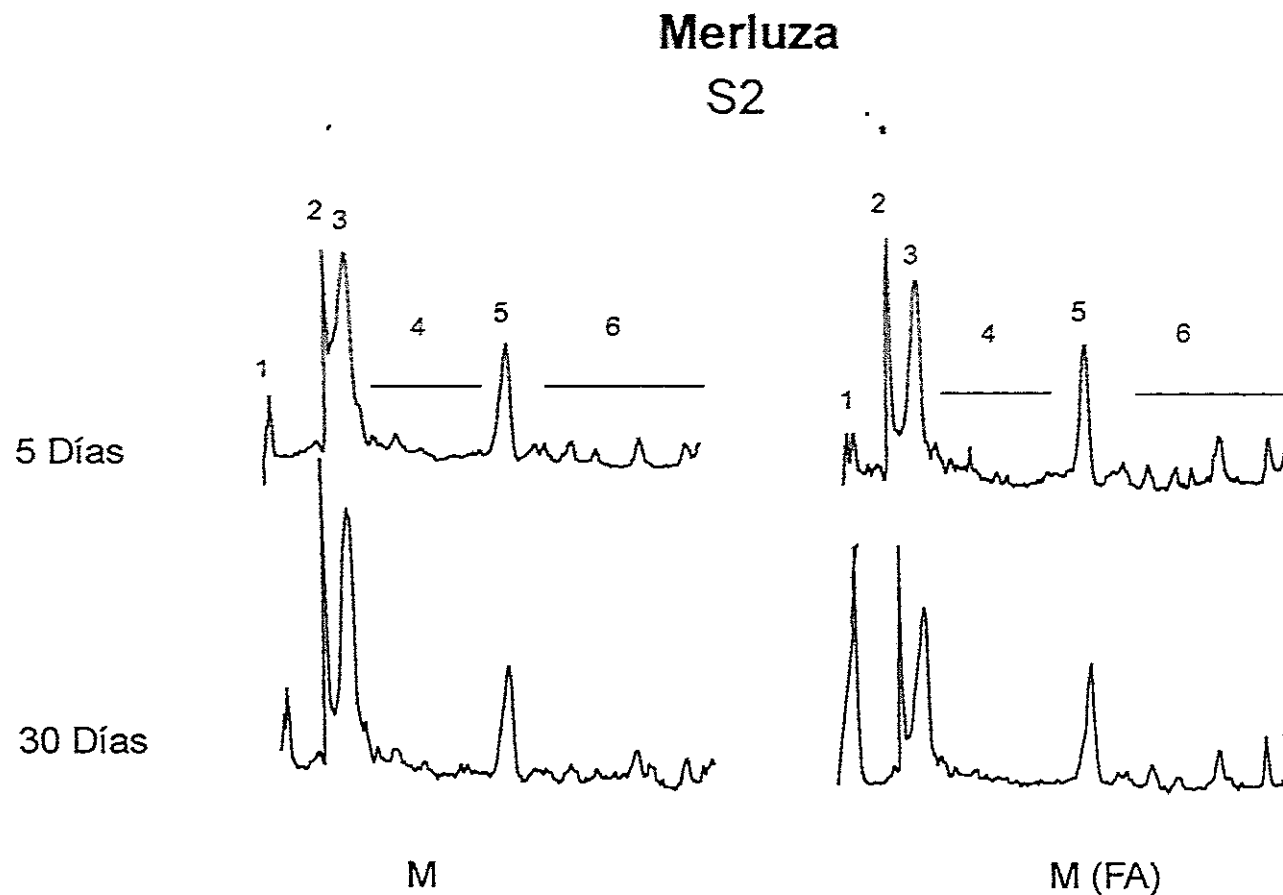


Figura 4.70.- Perfiles electroforéticos de proteína de merluza extraída en SDS 2% (S2) a los 5 y 30 días de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Geles al 12,5%. M: lote testigo y M (FA): lote con 6 mM de formaldehído (FA). Picos identificados en apartado 4.4.1.

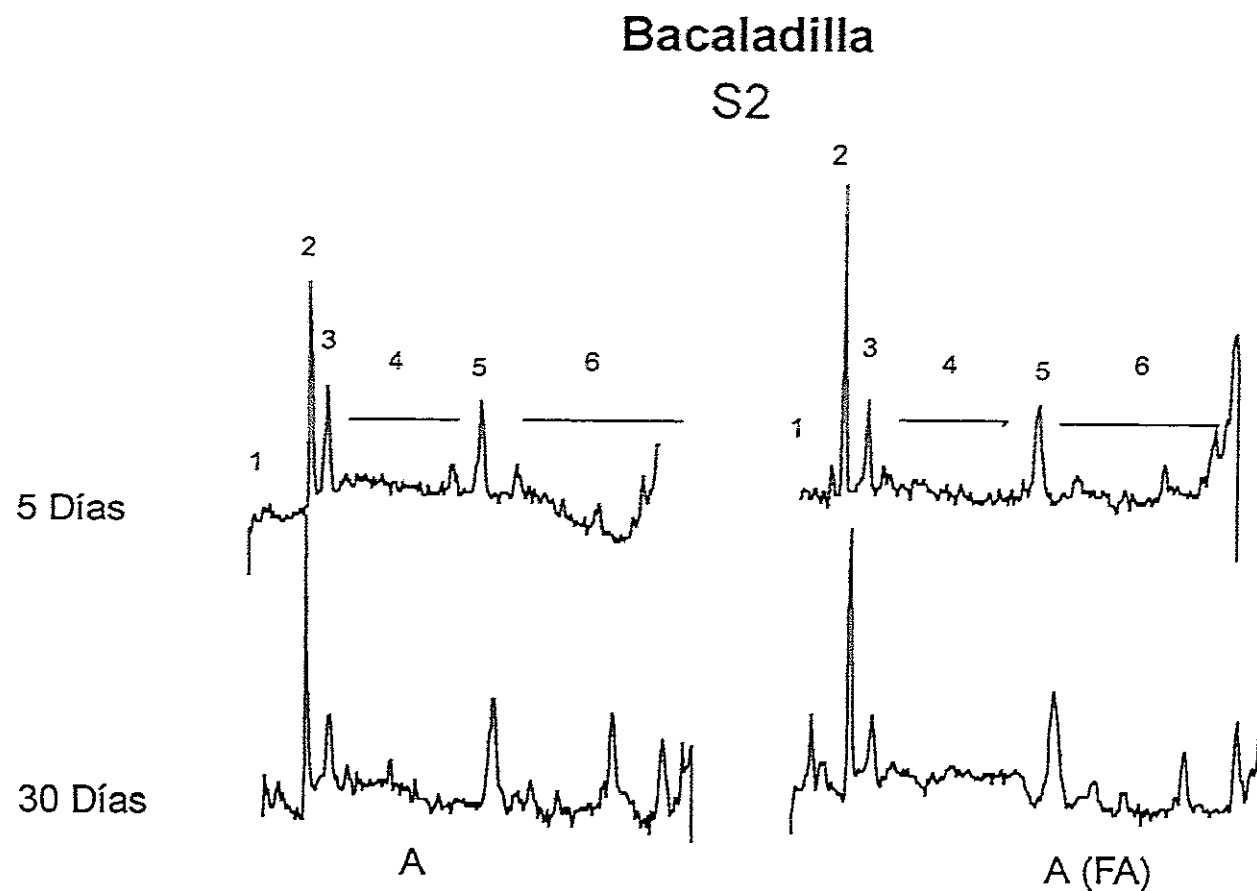


Figura 4.71.- Perfiles electroforéticos de proteína de bacaladilla extraída en SDS 2% (S2) a los 5 y 30 días de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Geles al 12,5%. A: lote testigo y A (FA): lote con 6 mM de formaldehído (FA). Picos identificados en apartado 4.4.1.



no se observaron diferencias debidas a la adición de FA. Tampoco se observaron en esta especie agregados de alto PM en los geles, probablemente debido al mayor tamaño de los mismos, lo cual explica los datos de solubilidad en SDS (S2) tan bajos encontrados (figura 4.57.). En bacaladilla hay que tener en cuenta que el aumento relativo que se observa en el pico 2 es artificial y causado por el ajuste del perfil para poder mostrar con claridad los cambios, ya que la concentración de la muestra fue muy baja.

Los perfiles de las fracciones S2 a los 30 días muestran el efecto de la conservación en congelación sobre la composición de la proteína extraída con SDS 2%. Este fue diferente en cada especie y en función de la adición de FA. En bacalao (figura 4.69.) no se observaron cambios en ambos lotes (testigo y con 6mM de FA). En merluza (figura 4.70.) no hubo cambios en el lote testigo, sin embargo en el lote con FA hubo un aumento del pico 1 y una disminución concomitante de la intensidad del pico de CPM en el último control realizado. Esto indica, en merluza, el FA necesita mayor tiempo de conservación que en bacalao para provocar el efecto ya comentado de aparición de agregados formados por la intervención de enlaces covalentes en S2. Se podría inferir que el FA aumentó la cantidad de este tipo de enlaces en P1 y que esta acción se vio favorecida con el tiempo de conservación. En bacaladilla (figura 4.71.) se observó que, en ambos lotes, la conservación en congelación produjo una disminución de la intensidad de la banda de CPM y un aumento en la de la Ac y PM inferiores a 20 kDa (CLMs). En bacaladilla no se habían agregados covalentes no S-S en la fracciones S2 al inicio del estudio y la conservación en congelación tampoco dió lugar a la aparición de los mismos en las electroforesis. Esto sugiere que los agregados formados son de tamaño mayor que en las otras especies y no son extraídos en las fracciones solubles.

#### Cambios electroforéticos en la proteína extraída en SDS 2% + 6-ME 5% (S3)

Los perfiles de las fracciones proteicas extraídas en SDS 2% + 6-ME 5% (S3) del agregado P1 de los distintos lotes en merluza y bacaladilla se representan en las figuras 4.72. y 4.72. En ellos se observa que las proteínas que se extraen en mayor proporción son CPM y Ac. Esto puede explicarse de la misma manera que se hizo con los perfiles de la fracción

# Merluza

S3

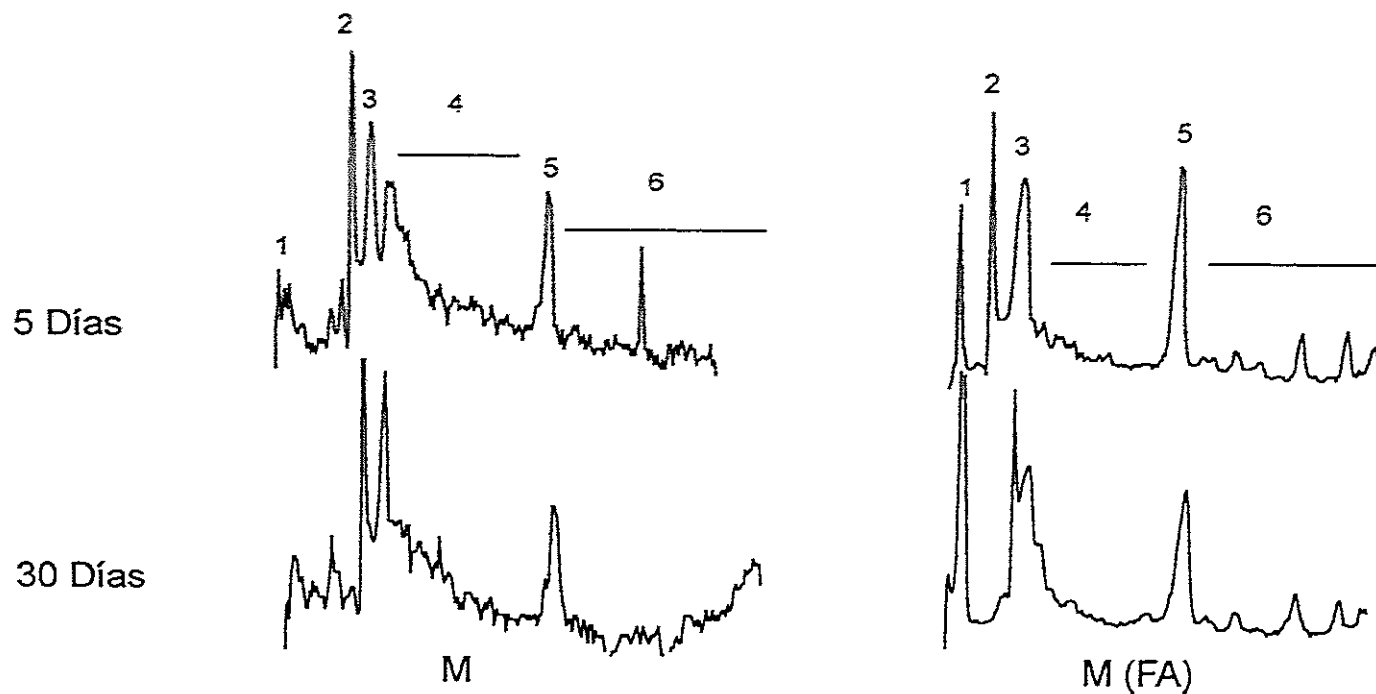


Figura 4.72.- Perfiles electroforéticos de proteína de merluza extraída en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) a los 5 y 30 días de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Geles al 12,5%. M: lote testigo y M (FA): lote con 6 mM de formaldehído (FA). Picos identificados en apartado 4.4.1.

Bacaladilla  
S3

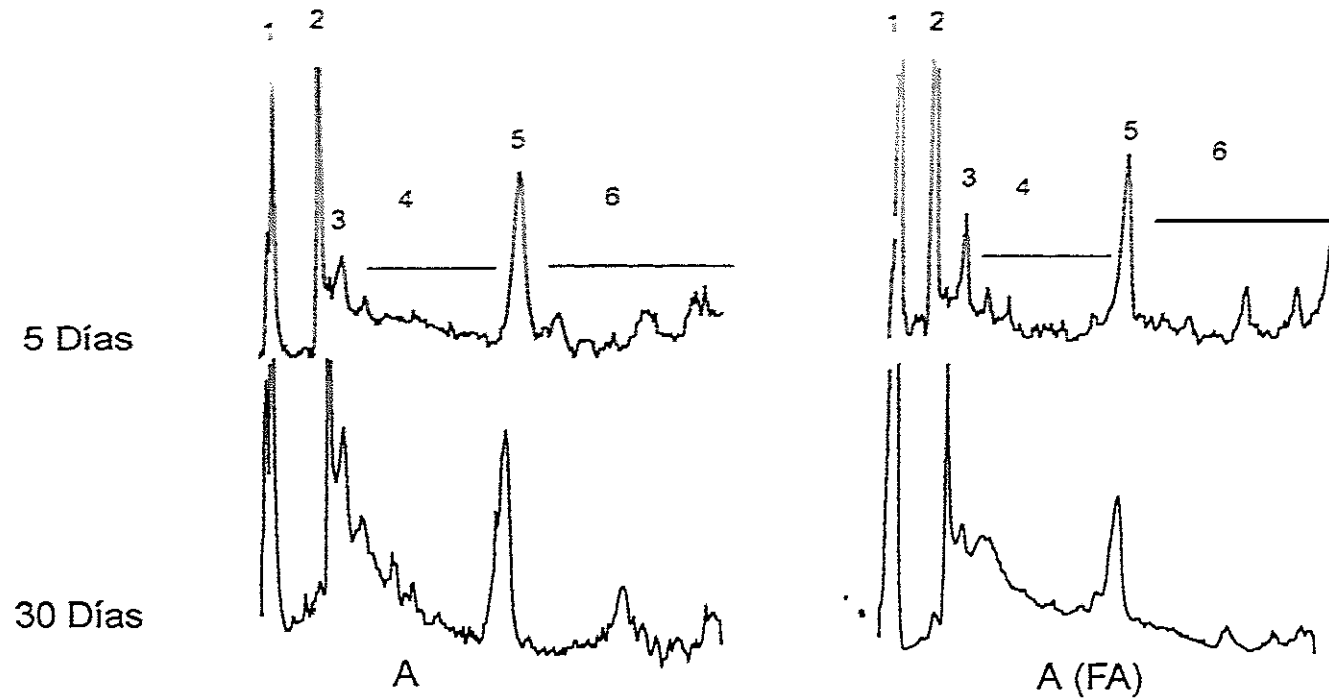


Figura 4.73.- Perfiles electroforéticos de proteína de bacaladilla extraída en SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) a los 5 y 30 días de conservación en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Geles al 12,5%. A: lote testigo y A (FA): lote con 6 mM de formaldehído (FA). Picos identificados en apartado 4.4.1.

S2 en el apartado anterior. En merluza (figura 4.72.) se observó mayor proporción de CPM que en bacaladilla (figura 4.73.), lo cual se podría explicar por la menor proporción de CPM en la AMN de bacaladilla (figura 4.68.). Además, cabe señalar que en merluza (figura 4.72.), el lote testigo presentó una mayor intensidad de las bandas en la zona entre la CPM y la Ac con respecto a lo observado en fresco (figura 4.67.). Esto podría atribuirse a agregación covalente no S-S de proteínas de igual o menor PM que la Ac o a una posible proteólisis.

El efecto del FA en ambas especies fue aumentar la intensidad del pico 1, aunque en bacaladilla sólo se observó este efecto a los 30 días de conservación. En esta especie, como ya se ha indicado, no se observaron agregados en el sobrenadante S2 (figura 4.71.). Matthews y col. (1979) observaron la aparición de una banda correspondiente a proteína de alto PM en los sobrenadantes obtenidos al tratar con SDS y  $\beta$ -ME los agregados insolubles en sal formados durante la conservación por congelación a  $-7^{\circ}\text{C}$  de músculo de bacalao picado. Lim y Haard (1984) también trataron el agregado insoluble en sal formado durante la conservación en congelación a  $-10^{\circ}\text{C}$  de músculo picado de hipogloso negro con SDS y  $\beta$ -ME, detectando la presencia y aumento a lo largo del tiempo de dicha banda de alto PM. Al igual que lo obtenido en nuestro caso en bacaladilla, Lim y Haard (1984) comprobaron que esta banda era más intensa cuando la proteína se solubilizaba con SDS y  $\beta$ -ME que cuando se solubilizaba únicamente con SDS.

Al aumentar el tiempo de conservación no hubo cambios importantes en ambos lotes de merluza (figura 4.72.). En bacaladilla (figura 4.73.), en el lote testigo, se observó un incremento de la intensidad de las bandas en la zona 4 al cabo de 30 y en el lote con FA se observó un aumento del pico 1. Se podría inferir que, en ambas especies, el FA aumentó la participación de los enlaces covalentes en el agregado no extraído con SDS 2% (P2) y que esta acción se vio favorecida con el tiempo de conservación. Esto corrobora lo observado en los estudios de extractabilidad (apartado 4.7.2.5.).

De los resultados obtenidos se deduce que la congelación y conservación en congelación produce la agregación de la AMN, de tal manera que la solubilidad en NaCl 0,6 M disminuye. La cantidad de proteína insolubilizada depende de la especie y de la adición de

FA. En esta agregación intervienen interacciones secundarias y covalentes disulfuro o no disulfuro. Esto está de acuerdo con lo encontrado por Tsuchiya y col. (1979), Jiang y col. (1988 a y b) y Cofrades (1994), en SM y por otros autores en músculo entero o picado (Matthews y col., 1980; Lim y Haard, 1984; Owusu-Ansah y Hultin, 1986). Sin embargo, la implicación de estos depende también de la especie y de la presencia o no de FA.

En ausencia de FA, en bacaladilla la agregación fue mayor y en el agregado formado hubo mayor participación de interacciones covalentes que en merluza y bacalao. Respecto a la participación de grupos S-S en el agregado, debido a que la proteína agregada por este tipo de enlaces puede enmascarse cuando se forman otros covalentes y pueden no ser detectados, por lo que no se pudo establecer comparaciones entre los distintos lotes de las tres especies. Sin embargo, el hecho de que se extraiga proteína del agregado no extraído con SDS 2% (P2) por tratamiento de este con SDS 2% +  $\beta$ -ME 5% (S3) en algunos lotes indica la participación de estos enlaces en la agregación.

La adición de FA a la AMN en fresco, independientemente de la especie, produjo una agregación debida fundamentalmente a interacciones secundarias, puesto que se puede solubilizar en su totalidad, aun cuando no se puede descartar la participación de enlaces disulfuro o covalentes de otro tipo, ya que en las electroforesis se observa la presencia de agregados solubles en SDS 2% a través de un aumento del pico 1 respecto del control.

La acción del FA durante la congelación y conservación en congelación dio lugar a un descenso de la solubilidad respecto al lote testigo en las tres especies, causando además cambios en la naturaleza de esta agregación. Podría establecerse una relación entre la calidad de la proteína y los cambios observados. Así, si tomamos como índice de calidad inicial de la proteína la solubilidad de la AMN en NaCl al congelar se deduce que cuando esta fue muy buena (bacalao), el FA tuvo un gran efecto agregante, aunque las interacciones que dan lugar a esta mayor agregación fueron muy débiles. Cuando la calidad fue inferior (merluza), el efecto agregante del FA fue menor pero aumentó la participación de enlaces covalentes en esta agregación con el tiempo de conservación. Cuando la calidad inicial fue baja (bacaladilla), se observó una gran proporción de enlaces covalentes en la agregación desde el inicio y la acción

del FA fue poco evidente tanto en cantidad de agregado formado como en proporción de enlaces covalentes y cambios en esta a lo largo del tiempo.

El FA dió valores de insolubilización similar en dos muestras de distinta calidad (figura 4.55., M y A), sin embargo, la naturaleza de los enlaces implicados en esa agregación así como los cambios en esta a lo largo del tiempo de conservación fue muy distinta en ambas. Esto hace que la controversia sobre si el FA forma o no enlaces covalentes tenga que enfocarse de otra manera, dada la influencia de la calidad inicial de la proteína en la acción del mismo.

La presencia de agregados de alto peso molecular detectados en todas las fracciones solubles y extraídas indica la participación de los enlaces covalentes en la agregación desde el inicio de la misma. Esto fue más evidente en los lotes con FA añadido, lo que sugiere la influencia del mismo en la formación de dichos enlaces. Esto corrobora lo observado en el estudio de extraetabilidad del agregado insoluble en merluza y bacaladilla. En bacalo no se observó un incremento de la proporción de la fracción no extraíble por efecto del FA, sin embargo, los resultados de electroforesis sugieren que este tuvo lugar aunque no fue detectado por el estudio de extraetabilidad.

En todos los casos, las proteínas que más participaron en la agregación fueron la miosina y la Ac, especialmente la primera. El FA aumentó la implicación de la miosina en la agregación, dependiendo este efecto de la especie. El tratamiento con SDS 2% del agregado insoluble formado en los lotes testigo permitió extraer CPM en una proporción superior respecto a la encontrada en fresco, indicando que en ausencia de FA, la mayor agregación observada en esta proteína se debió a interacciones secundarias. Sin embargo, en los lotes con FA no hubo una mayor extracción de CPM en S2 o S3 a medida que el agregado insoluble (P1) se enriqueció en la misma. Por lo tanto, se podría inferir que el FA favoreció la agregación de la CPM por enlaces covalentes durante la conservación.

En los estudios de extraetabilidad de músculo (apartado 4.4.3.) se observó un incremento de la implicación de la CPM en la formación de enlaces covalentes al aumentar

el tiempo de conservación. Teniendo en cuenta lo observado en el presente sistema modelo, este aumento podría relacionarse con el aumento en la formación de FA detectado a lo largo de la conservación.

## CONCLUSIONES



## 5.- CONCLUSIONES

- 1.- En los lotes se detectó una distinta funcionalidad inicial y, con el tiempo de conservación, una disminución de la funcionalidad de músculo, un incremento en la resistencia a la cizalladura y un aumento en la formación de DMA y FA diferentes en función de la especie y, en bacalao, del grado de integridad del músculo. Por lo tanto se ha obtenido un sistema adecuado para estudiar la insolubilización del músculo y la formación de agregados en condiciones homogéneas y en el que los cambios en funcionalidad y textura variaron a lo largo de la conservación en congelación.
- 2.- La agregación observada en músculo picado y filetes de bacalao y músculo picado de merluza y bacaladilla se ha manifestado en una disminución de la extractabilidad de las proteínas miofibrilares en NaCl 0,6 M y un consiguiente incremento en la cantidad de proteína extraída en SDS 2% y SDS 2% + ME 5%, y en muchos casos, en un incremento de la fracción no extraída por estos agentes. Además se han detectado agregados solubles en las fracciones extraídas en NaCl 0,6 M, SDS 2% y SDS 2% + ME 5%, que se han puesto de manifiesto por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, por microscopía electrónica de transmisión y por cromatografía de filtración en gel.
- 3.- La velocidad de agregación de proteínas miofibrilares en NaCl 0,6 M dependió de la especie y del grado de integridad del músculo. Además, en músculo picado de bacalao existió evidencia de un aumento en número y tamaño de agregados solubles en NaCl 0,6 M con el tiempo de conservación. Aunque no hemos encontrado evidencias directas en otros lotes, no se descarta que esto ocurra.
- 4.- Las proteínas que más participaron en la formación del agregado no extraído en NaCl 0,6 M fueron la miosina y en menor grado la actina, observándose mayor participación de la miosina en bacalao y bacaladilla. Las tropomiosinas y troponinas fueron las menos implicadas. Esta distinta contribución dio lugar a cambios en la composición de la AMN extraída en NaCl 0,6 M.

- 5.- Paralelamente a la agregación, tuvo lugar una desnaturalización de la miosina durante la conservación en congelación, que se puso de manifiesto por la pérdida de actividad ATP-ásica de la AMN por unidad de CPM. Esta desnaturalización fue más lenta en filetes, lo cual podría relacionarse con la menor pérdida de extractabilidad en NaCl 0,6 M observada en este lote.
- 6.- La funcionalidad inicial observada en los diferentes lotes y su disminución en las fracciones extraídas en NaCl 0,6 M con el tiempo de conservación se relacionó con las diferencias en composición proteica y estado de desnaturalización y agregación.
- 7.- En los agregados de proteínas miofibrilares de la fase no extraída en NaCl 0,6 M participaron enlaces secundarios, S-S y covalentes no disulfuro y su porcentaje dependió de la especie, pero no del grado de integridad. En los agregados solubles se detectó la implicación de enlaces covalentes en todos los lotes. Además, en músculo picado de bacalao se observó también participación de interacciones secundarias y/o disulfuro que no se pudieron detectar en los otros lotes, aunque no se descarta su existencia.
- 8.- Con independencia de la cantidad de proteína agregada, la importancia de los distintos tipos de enlaces en el agregado no extraído en NaCl 0,6 M cambió a lo largo de la conservación. En músculo picado se observó un aumento en la proporción de covalentes. En bacalao se debió a un incremento de enlaces S-S, mientras que en bacaladilla supuso un aumento en la participación de covalentes no S-S y en merluza de ambos. El menor grado de integridad del músculo se tradujo en una mayor proporción de enlaces S-S.
- 9.- De las proteínas que participaron en la agregación, la miosina pasó a formar enlaces covalentes a mayor velocidad. Esto fue especialmente evidente en bacaladilla.
- 10.- Durante la conservación, los lotes en los que se detectó más tempranamente FA unido presentaron mayor incremento de la participación de enlaces covalentes en los agregados no extraídos en NaCl 0,6 M. Esto parece indicar que el FA formado in situ acelera la formación de estos enlaces.

- 11.- En sistemas modelo de AMN aislada, el FA provocó agregación de la AMN. Se observó interacción positiva entre el efecto del FA y la congelación y/o conservación en congelación.
- 12.- No se observó mayor efecto del FA añadido a proteínas previamente desnaturalizadas por congelación. Por el contrario, parece que la insolubilización por acción del FA durante la congelación fué mayor cuando la AMN presentó más funcionalidad inicial.
- 13.- El tipo de enlaces que dieron lugar a agregación de la AMN en fresco por adición de FA, fueron de naturaleza secundaria, aunque en la fracción soluble en NaCl 0,6 M también se detectaron proteínas agregadas por enlaces covalentes. Durante la congelación y conservación, la naturaleza de los agregados dependió de la calidad inicial de la proteína. En bacalao, cuya AMN aislada fué de alta calidad, la agregación por FA añadido se debió a la formación de uniones secundarias; en merluza, cuyas proteínas fueron de calidad intermedia, el FA dio lugar a un aumento en la participación de enlaces covalentes y cuando la calidad inicial fue baja, como en bacaladilla, el FA no modificó apenas la naturaleza de la agregación.
- 14.- A lo largo del tiempo de conservación, la adición de FA a la AMN provocó un aumento de la cantidad y proporción de enlaces covalentes.
- 15.- El FA añadido a la AMN alteró el mecanismo de agregación, al aumentar la proporción de miosina en los agregados no extraídos en NaCl 0,6 M y su implicación en enlaces covalentes.
- 16.- El que en sistema modelo el FA favorezca la participación de la miosina en enlaces covalentes sugiere que el aumento en la agregación de la miosina por enlaces covalentes detectado en músculo podría relacionarse con el incremento en la formación de FA observado durante la conservación frigorífica.

## **BIBLIOGRAFIA**

## 6.- BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B.; Bray, D.; Levis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. 1992. *Biología Molecular de la célula*. 2ª Ed. Ed. Omega, Barcelona, España.
- Almandos, M.E., Giannini, D.H., Carlo, A.S. y Boeri, R.L. 1984. Relationship between the increase of total volatile bases and dimethylamine in frozen patagonian hake (*Merluccius hubbsi*). *Lebensm. Wiss. und Tech.*, 17:111.
- Amano, K. y Yamada, K., 1965. "A biological formation of formaldehyde in cod fresh" en "The technology of fish utilization" Ed. Kreuzer, R. Fishing News (Books) Ltd. Londres, Reino Unido. Pp. 73-78.
- Amano, K. y Yamada, K. 1964. The biological formation of formaldehyde in cod flesh. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 30(5):430-435.
- Ang, J.F. y Hultin, H.O. 1989. Denaturation of cod myosin during freezing after modification with formaldehyde. *J. Food Sci.*, 54(4):814-818.
- Andou, S., Takama, K. y Zama K. 1981. Interaction between lipid and protein during frozen storage. II. Interaction between water and lipid surrounding myofibrillar protein". *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 31:97-105.
- Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C). 1984. En "Official Methods of Analysis". 14 edición. Washington D.C., EEUU.
- Babbitt, J.K., Crawford, D.L., Law, D.K., 1972. Decomposition of trimethylamine oxide and changes in protein extractability during frozen storage of minced and intact hake (*Merluccius productus*) muscle. *J. Agr. Food Chem.*, 20(5):1052-1054.
- Banda, M.C.M. y Hultin, H.O. 1983. Role of cofactors in breakdown of TMAO in frozen red hake muscle. *J. Food Proc. Pres.*, 7:221.
- Barassi, C.A., Crupkin, M., Martone, C. y Trucco, R.E. 1982. Seasonal variation in the viscosity of the extracts of muscle proteins of hake (*Merluccius hubbsi*) stored on ice. *J. Sci. Food Agric.*, 32:303.
- Bechtel, P.J. 1986. Muscle Development and contractile proteins. En "Muscle as a food". Ed. P.J. Bechtel. Academic Press, Inc. Orlando, California. EEUU. Pp 1-35.
- Beveridge, T.; Toma, S.J. y Nakai, S. 1974. Determination of -SH groups and S-S groups in some food proteins using Ellman's reagent. *J. Food Sci.*, 39:49.
- Blight E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.*, 37:911-917.

- Borderías, A.J.; Lamúa, M. y Tejada, M. Texture analysis of fish fillets and minced fish by both sensory and instrumental methods. 1983. *J. Food Technol.*, 18:355-365.
- Borderías, A.J., Jiménez Colmenero, F. and Tejada, M., 1985 a. Parameters affecting viscosity as a quality control for frozen fish. *Marine Fisheries Review.*, 47(4):43-45.
- Borderías, A.J., Jiménez Colmenero, F. and Tejada, M., 1985 b. Viscosity and emulsifying ability of fish and chicken muscle protein. *J. Food Techn.*, 20:31-42.
- Buttkus, H. 1970. Accelerated denaturation of myosin in frozen solution. *J. Food Sci.*, 35:558-562.
- Buttkus, H. 1971. The sulfhydryl content of rabbit and trout myosins in relation to protein stability. *Can. J. Biochem.*, 49:97-102.
- Buttkus, H. 1974. On the nature of the chemical and physical bonds which contribute to some structural properties of protein foods: a hypothesis. *J. Food Sci.*, 39:484.
- Careche, M. 1988. Modificación de las proteínas de pescado durante la conservación en el estado congelado: interacciones lípido-proteína. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
- Careche, M y Jiménez-Colmenero, F. 1988. Oxidación de lípidos en pescado: procedimientos de determinación. *Grasas y Aceites*, 39:(6)387-396.
- Careche, M. y Tejada, M. 1988. Efecto de la temperatura de conservación (-12 y -18°C) sobre la estabilidad del músculo de merluza picado. *Rev Agroquim. Technol. Aliment.*, 28(1):109-113.
- Careche, M. y Tejada, M. 1990 a. The effect of neutral and oxidized lipids on functionality in hake (*Merluccius merluccius* L.): a dimethylamine and formaldehyde-forming species during frozen storage. *Food Chem.*, 36:113-128.
- Careche, M. y Tejada, M. 1990 b. Effect of neutral and oxidized lipids on protein functionality in megrim (*Lepidorhombus whiffiagonis* W.) and sardine (*Sardina pilchardus* R.) during frozen storage. *Food Chem.*, 37:275-285.
- Careche, M. y Tejada, M., 1991. Interaction between triolein and natural hake actomyosin during frozen storage at -18°C. *J. Food Biochem.*, 15:449-462.
- Careche, M. y Tejada, M. 1994. Hake natural actomyosin interaction with free fatty acids during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.*, 64:501-507.
- Careche, M. y Reece, P. 1996. Production of formaldehyde in frozen fish. Documento interno. Torry Research Station. Aberdeen. Reino Unido.
- Castell C. H. y Smith, B. 1973. Measurement of formaldehyde in fish muscle using TCA

extraction and the Nash reagent. J. Fish. Res. Bd. Can., 30:91-98.

Castell, C.H.; Neal, W.B. y Dale, J. 1973. Comparison of changes in trimethylamine, dimethylamine and extractable protein in iced and frozen gadoid fillets. J. Fish. Res. Bd. Can., 30(8):1246-1248.

Castell, C.H., Neal, W., y Smith, B. 1970. Formation of dimethylamine in stored frozen sea fish. J. Fish. Res. Bd. Can., 27:1685.

Castell, C.H., Smith, B., y Neal, W. 1971. Production of dimethylamine in muscle of several species of gadoid fish during frozen storage, especially in relation to presence of dark muscle. J. Fish. Res. Board. Can., 28:1-5.

Cheftel, J. C.; Cuq, J.L. y Lorient, D. 1989. En "Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades Funcionales. Valor Nutritivo. Modificaciones Químicas". Ed. Acribia. Zaragoza. España.

Cofrades, S., Careche, M., Carballo, J. y Jiménez Colmenero, F. 1993. Protein concentration, pH and ionic strength affect apparent viscosity of actomyosin. J. Food Sci., 58(6): 1269.

Chalmers, M.; Careche, M. y Mackie, I.M. 1992. Properties of actomyosin isolated from cod (*Gadus morhua*) after various periods of storage in ice. J. Sci. Food Agric., 58:375-383.

Chen, C.S.; Hwang, D.C. y Jiang, S.T. 1989. Effect of storage temperatures on the formation of disulfides and denaturation of milkfish (*Chanos chanos*) myosin. J. Agric. Food Chem., 37:1228-1231.

Chen, C.S.; Hwang, D.C. y Jiang, S.T. 1988. Purification and characterization of milkfish (*Chanos chanos*) myosin. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 54:1423-1427.

Childs, E.A. 1973. Interaction of formaldehyde with fish muscle *in vitro*. J. Food Sci., 38:1009-1011.

Cofrades, S. 1994. Funcionalidad y características físico-químicas de actomiosina procedente de distintas especies. Influencia de la congelación y conservación en estado congelado. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid.

Cofrades, S.; Careche, M.; Carballo, J. y Jimenez Colmenero, F.J. 1993. The apparent viscosity of actomyosin from several species. J. Food Sci., 58(6):1269-1272.

Connel, J.J. 1960 a. Studies on the proteins of fish skeletal muscle. Denaturation and aggregation of cod myosin. Biochem. J., 75:530.

Connel, J.J. 1960 b. Changes in the actin of cod flesh during storage at -14°C. J. Sci. Food Agric., 11:515.

Connell, J.J. 1960 c. Changes in the adenosinetriphosphatase activity and sulphydryl groups

of cod flesh during frozen storage. J. Sci. Food Agric., 11:245-249.

Connell, J.J., 1965. The use of sodium dodecyl sulphate in the study of protein interactions during the storage of cod flesh at  $-14^{\circ}\text{C}$ . J. Sci. Food Agric., 16:769-783.

Connell, J.J. 1975. The role of formaldehyde as a protein crosslinking agent acting during the frozen storage of cod. J. Sci. Food Agric., 26:1925-1929.

Connel, J.J y Howgate, P.F. 1968. Sensory and objective measurement of the quality of frozen stored cod of different initial freshness. J. Sci. Food Agric., 19:342-354.

Connel, J.J y Howgate, P.F. 1969. Sensory and objective measurement of the quality of frozen stored haddock of different initial freshness. J. Sci. Food Agric., 20:469-476.

Crawford, D.L., Law, D.K., Babbitt, J.K. y McGill, L.A. 1979. Comparative stability and desirability of frozen pacific hake fillet and minced flesh blocks. J. Food Sci., 44(2):363-367.

Crupkin, M., Barassi, C.A., Argüello, J.M. y Trucco, R.E. 1982. Effect of post-rigor fish storage on ice on physicochemical properties of actomyosin. J. Sci. Food Agric., 33:1129-1134.

Crupkin, M., Barassi, C.A.; Matrone, C.B.; Trucco, R.E. 1979. Effect of storing hake (*Merluccius merluccius hubbsi*) on ice on the viscosity of the extract of soluble muscle protein. J. Sci. Food Agric., 30:911-913.

Dagbjartsson, B. 1975. Utilization of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) for human consumption. J. Fish. Res. Board Can., 32:747-751.

Del Mazo M., Huidobro, A., Torrejón, P., Tejada, M. and Careche, M. 1994. Role of formaldehyde in formation of natural actomyosin aggregates in hake during frozen storage. Z. Lebensm. Unters. For., 198:459-464.

Dingle, J.R., 1978. Quality deterioration in the flesh of *Merluccius* species and other gadidae caused by the formation of formaldehyde during frozen storage. Supplement to the report of the technical consultation on the Latin American Hake Industry, Montevideo, Oct. 24-28, FAO Fisheries Report No 203.

Dingle J.R. y Hines, J.A. 1975. Protein instability in frozen flesh from fillets and frames of several commercial atlantic fishes during storage at  $-5^{\circ}\text{C}$ . J. Fish Res. Board Can., 32:775.

Dingle, J.R., Keith, R.A. y Lall, B. 1977. Protein instability in frozen storage induced in minced muscle of flatfishes by mixture of muscle of red hake. Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 10(3):143-146.

Dyer, W.J. 1951. Protein denaturation in frozen and stored fish. Food Res., 16:522.

Dyer W.J. y Dingle J.R. 1961. Fish proteins with special reference to freezing. En " Fish and



- Food I. Biochemistry and Microbiology". Ed. W.J. Dyer. Academic Press, Nueva York. EEUU. Pp. 257-327.
- Dyer, W. J. y Morten, M.L. 1956. Storage of frozen plaice fillets. J. Fish. Res. Bd. Can., 13:129.
- Dyer, W. J., Morton, M.L y Fraser, D.Y. 1956. Storage of frozen rosefish fillets. J. Fish. Res. Bd. Can., 13:569.
- Edelstein, S.T. 1991 a. Detergents. En "Protein Methods". Eds. S.T. Edelstein y D. M. Bollag. Wiley-Liss, Inc. New York. EEUU. Pp 12-18.
- Edelstein, S.T. 1991 b. Reducing agents. En "Protein Methods". Eds. S.T. Edelstein y D. M. Bollag. Wiley-Liss, Inc. New York. EEUU. P.11.
- Elzinga, M., Maron, B.J. y Adelstein, R.S. 1976. Human heart and platelet actins are products of differens genes. Science, 191:94-95.
- F.A.O. "Fishery Stafics. Catches and Landings". Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1995. FAO Fisheries Series N°44. FAO Statics Series N°123.
- Fiske, C.H. and SubbaRow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 66:375-400.
- Fretheim, K., Sleigh, R.W. y Burley, R.W. 1986. Formation of complexes between lecitin and apovitellenin I. An avian egg-yolk apoprotein. Lipids, 21:127-216.
- García Palacios, I. 1987. Estudio de la composición de las especies de anchoa, sardina, chicharro y merluza del golfo de Vizcaya y su variación estacional. Informes técnicos del Dpto. Agriculatura y Pesca del Gobierno Vasco. España.
- Gill, T.A., Keith, R.A. y Smith Lall, B. 1979. Textural deterioration of red hake and haddock muscle in frozen storage as related to chemical parameters and changes in the myofibrillar proteins. J. of Food Sci., 44(3):661-667.
- Gonzalez, M.C. 1991. Modificaciones del músculo de merluza (*Merluccius merluccius* L.) durante su conservación en estado congelado. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- Grassé, F.G. 1977. En "Zoología (2) Vertebrados, anatomía comparada". Ed. F.G. Grasse. Toray-Masson, Barcelona. España. Pp. 191-203.
- Gray, J.I. y Pearson, A.M. 1987. Rancidity and warmed over flavor. En "Advances in meat research. Restructured meat and poultry products". Eds. A.M. Pearson y T.R. Duston. AVI Book, Van Nostrand Reinhold Company, Nueva York. EEUU. Pp. 221-269.
- Haard, N.F. 1990. Biochemical reactions in fish muscle during frozen storage. En "Seafood

- Science and Technology". Eds. G. Bligh. Fishing News Books. Londres, Reino Unido. Pp 176-209.
- Hamada, I.; Tsuji, K; Nakayama, T. y Niwa, E. 1977. Oxidative denaturation of actomyosin. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 43, 1105-1109.
- Hamm, R. 1975. On rheology of minced meat. J. Text. Stud., 6: 281-296.
- Hames, B.D. 1985. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. En "Gel Electrophoresis of proteins. A practical approach". Eds. Hames, B. D., Rickwood D., IRL Press, Oxford. Reino Unido. Pp 1-91.
- Harrington, W.F. y Rodgers, M.E. 1984. Myosin. Ann. Rev. Biochem., 53:35-73.
- Hayakawa, S., Nakai, S. 1985. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. J. Foo Sci., 50(2):486-491.
- Hiltz, D.F., Lall, B.S., Lemon, D.W. y Dyer, W.J. 1976. Deteriorative changes during frozen storage in fillets and minced flesh of silver hake (*Merluccius bilinearis*) processed from round fish held in ice and refrigerated sea water. J. Fish Res. Board Can., 33:2560.
- Howard, J. 1994. Clamping down on myosin. Nature. 368:98-99.
- Huidobro, A., 1990. Modificaciones de las propiedades funcionales del músculo de pescado de especies infrautilizadas conservadas en congelación. Tesis doctoral, Fac. de Farmacia, Univ. Complutense de Madrid. España.
- Huidobro, A. y Tejada, M. 1992. Foaming capacity of fish minces during frozen storage. J. Sci. Food Agric., 60:263-270.
- Huidobro, A. y Tejada, M. 1993 a. Emulsifying capacity of fish mince from several species during frozen storage. J. Sci. Food Agric., 61:333-339.
- Huidobro, A. y Tejada, M. 1993 b. Revisión: Propiedades de hidratación del músculo de pescado. Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment., 33(4):365-381.
- Huidobro, A. y Tejada, M. 1995. Alteration of the electrophoretic pattern of myofibrillar proteins in fish mince during frozen storage. Z. Lebensm. Unters. For., 200:247-251.
- Hultin, H.O. 1992 a. Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) demethylation and protein denaturation in fish muscle. En "Advances in seafood biochemistry: composition and quality". Eds. Frick y Martin. Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, Pennsylvania. EEUU. Pp. 25-42.
- Hultin, H.O. 1992 b. Quality assurance in fish industry. En "Developements in food science". Eds. Huss, H.H., Jakobsen, M. and Liston, J. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. Holanda. P. 25.

Hultin, H.O., Feng, Y. y Stanley, D.W. 1995. A re-examination of muscle protein solubility. *J. Muscle Foods*, 6:91-107.

Huxley, H.E. 1972. Molecular basis of contraction in cross-striated muscles. En *The structure and function of muscle*. Ed. Bourne, G.H. Academic Press Inc. Nueva York, EEUU.

Instituto Internacional del Frío (IIF). 1990. En *Alimentos congelados. Procesado y distribución*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España.

Ironside, J.I.M. ; Love, R.M. 1958. Studies on protein denaturation in frozen fish I. Biological factors influencing the amounts of soluble and insoluble proteins present in the muscle of the North Sea cod. *J. Sci. Agric.*, 9:597-617.

Jahneke, M., Baker, R.C. y Regenstein, J.M. 1992. Frozen storage of unwashed cod (*Gadus morhua*) frame mince with and without kidney tissue. *J. Food Sci.*, 57(3):575-580.

Jarénback, L. y Liljemark, A. 1975. Ultrastructural changes during frozen storage o cod (*Gadus morhua* L.) II. Structure of extracted myofibrillar proteins and myofibril residues. *J. Fd. Technol.*, 10:309-325.

Jiang, S.T.; Hwang, B.S. y Tsao, C.Y. 1987 a. Effect of adenosine-nucleotides and their derivatives on the denaturation of myofibrillar proteins *in vitro* during frozen storage al -20°C. *J. Food Sci.*, 52(1):117-123.

Jiang, S.T.; Hwang, D.C.; Chen, C.S. 1988 a. Effect of storage temperature on the formation of disulfides and denaturation of milkfish myosin (*Chanos chanos*). *J. Food Sci.*, 53:1333-1335.

Jiang, S.T.; Hwang, D.C.; Chen, C.S. 1988 b. Denaturation and change in SH groups from milkfish (*Chanos chanos*) during frozen storage at -20°C. *J. Agric. Food Chem.*, 36:433-437.

Jiang, S.T.; San, P.C. y Japit. L.S. 1989. Effect of storage temperatures on the formation of disulfides and denaturation of tilapia hybrid actomyosin (*Tilapia nilotica x Tilapia aurea*). *J. Agric. Food Chem.*, 37:633-636.

Jiang, S.T.; Tsao, C.Y. y Lee, T.C. 1987 b. Effect of free amino acids of Mackerel myofibrillar proteins *in vitro* during frozen storage at -20°C. *J. Agric. Food Chem.*, 35:28-33.

Jiménez-Colmenero, F. y Borderías, A.J. 1983. A study of the effects of frozen storage of certain functional properties of meat and fish protein. *J. Food Technol.*, 18:731-737.

Kanner, J., German, J.B. y Kinsella, J.E. 1987. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *CRC Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.*, 25:317-364.

Karel, M. 1973. Protein lipid interactions. *J.Food Sci.* 38:756-763.

Kato, A. and Nakai, S. 1980. Hydrophobicity determined by a fluorescent probe method, and

its correlation with surface properties of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 624:13.

Kawashima M., Arai K. and Saito T. 1973. Studies on muscular proteins of fish. IX. An attempt on quantitative determination of actomyosin in frozen "surimi" from Alaska Pollack. *Bull Jap. Soc. Sci. Fish.*, 39:207-214.

Kelleher, S.D., Buck, E.M., Hulting, H.O., Parking, K.L., Licciardello, J.J. y Damon, R.A. 1981. Chemical and physical changes in red hake blocks during frozen storage. *J. Food Sci.*, 47:65-70.

Khayat, A. y Schwall, D. 1983. Lipid oxidation in seafood. *Food Technol.*, 6:130-140.

Kim, H.J., Loveridge, V.A. y Taub, Y.A. 1984. Myosin cross-linking in freeze dried meat. *J. Food Sci.*, 49:699-703.

King, F.J. 1966. Ultracentrifugal analysis of changes in the composition of myofibrillar proteins extracts obtained from flesh and frozen cod muscle. *J. Food Sci.*, 31:649-663.

King, F.J., Anderson, M.L., Steinberg, M.A. 1962. The effect of linoleic and linoleic acids on the solubility of cod actomyosin. *J. Food Sci.*, 27:363-366.

Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of proteins in food: a survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition*, 7:219-280.

Kleimenov I. 1983. Nutritive value of fish. En "Handbook of fishery technology". Vol I. Ed. V.M. Novikov. Russian Translation Series. A.A. Balkema, Rotterdam. Holanda.

Knudsen, I., Reimers, K., Berner, L., Jensen, N.C. 1985. A modification of Bligh and Dyer's oil extraction method reducing chloroform vapour outlet. O.E.A./II 85, Hamburgo, Western European Fish Technologist' Association (WEFTA).

Kostuch, S. y Sikorski, Z.E. 1977. Interaction of formaldehyde with cod proteins during frozen storage. IIF-IIR-Commissions C1, C2 - Karlsruhe, Alemania.

Kramer, A., Burkardt, G.J. y Rogers, H.P. 1951. The shear press. A device for measuring food quality. *Canner*. 112:34.

Laird, W.M. y Mackie, I.M. 1979. Studies of the changes in the proteins of cod-frame minces during frozen storage at -15°C. *Adv. Fish Sci. Tech.* 434-438. Jubilee Conference of the Torry Research Station, Aberdeen. Scotland. Reino Unido.

Laird, W.M.; Mackie, I.M. y Regenstein, J.M. 1981. Deterioration of frozen cod and haddock minces. En "Advances in the Refrigerated Treatment of Fish". Refrigeration Science and Technology, I.I.R. Commissions C2, D1, D2, D3. Boston (MA). EEUU. Pp. 395-400.

Laird, W.M. y Mackie, I.M. 1981. Protein changes during frozen storage of cod. En "Advances in the Refrigerated Treatment of Fish". Refrigeration Science and Technology,

- I.I.R. Commissions C2, D1, D2, D3, Boston (MA), EEUU. Pp. 349-355.
- Laird, W.M., Mackie, I.M. y Hattula, T. 1980. Studies of the changes of the proteins of cod frames minces during frozen storage at  $-18^{\circ}\text{C}$ . En "Advances in Fish Science and Technology". Ed. J.J. Connell. Fishing News Books Ltd. Surrey, Reino Unido. Pp. 428-434.
- LeBlanc, E.L., LeBlanc, R.J., Blum, I.E. 1988. Prediction of quality in frozen cod (*Gadus morhua*) fillets. J. of Food Science, 53(2):328-340.
- LeBlanc E.L. y LeBlanc R.J. 1989. Separation of cod (*Gadus morhua*) fillet proteins by electrophoresis and HPLC after various frozen storage treatments. J. Food Sci., 54(4):827-834.
- LeBlanc, E.L. y LeBlanc, R.J. 1992. Determination of hydrophobicity and reactive groups in proteins of cod (*Gadus morhua*) muscle during frozen storage. Food Chem., 43:3-11
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. 1993. Principles of Biochemistry. 2ª Edición. New York Worth Publishers. Nueva York, EEUU.
- Lewin, S. 1974. Displacement of water and its control of biochemical reactions. Ed. Lewin, S. Academic Press. Londres. Reino Unido.
- Li-Chan, E. y Nakai, S. 1990. Importance of hydrophobicity of proteins in food emulsions. En "Microemulsions and emulsions in foods. Hydrophobicity of proteins". ACS Symposium Series. 448:193-211.
- Li-Chan, E., Kwan, L. y Nakai, S. 1986. Physicochemical and functional properties of salt-extractable proteins from chicken breast muscle deboned after different postmortem holding times. Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 19:241.
- Li-Chan, E., Nakai, S. y Wood, D.F. 1984. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. J. Food Sci., 49:345.
- Li-Chan, E., Nakai, S. y Wood, D.F. 1985. Relationship between functional (fat binding, emulsifying) and physicochemical properties of muscle proteins. Effect of heating, freezing, pH and species. J. Food Sci., 50:1034.
- Lillard, D.A. 1987. Oxidative deterioration in meat, poultry and fish. En "Warmed over flavour of meat". Eds. A.J. St. Angelo y M.E. Bailey. Ac. Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publ., Londres. Reino Unido. Pp. 41-67.
- Lillevik, H.A. 1970. The determination of total organic nitrogen. En "Methods in food analysis. Physical chemical and instrumental methods of analysis". Ed. M.A. Joslyn. Academic Press. Nueva York.
- Lim, H. y Haard, N.F. 1984. Protein insolubilization in frozen Greenland halibut. J. Food Biochem., 8:163-187.

- Lowey, S., Slayter, H.S., Weeds, A.G. y Baker, H. 1969. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.*, 42:1.
- Love, R.M. 1966. The freezing of animal tissue. En "*Cryobiology*". Ed. E.T. Meryman. Academic Press. Londres/Nueva York. Pp 317-405.
- Love, M.R. 1988. The Food Fishes. Their intrinsic variation and practical implications. Meryman, H.T. (Ed). Academic Press. Londres.
- Lowry, O.H. Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- Lundstrom R.C., Correia, F.F., Wilhelm, K.A. 1982. Enzymatic dimethylamine and formaldehyde production in minced American plaice and blackback flounder mixed with red hake TMAO-ase active fraction. *J. Food Sci.*, 47(4):1305-1310.
- Mackie, I.M. The effects of freezing on flesh proteins. 1993. *Food Reviews International*. 9(4): 547-610.
- Mackie, I.M. y Thomson, B.W. 1974. Decomposition of trimethylamine oxide during iced and frozen-storage of whole and comminuted tissue of fish. *Proc. IV Int. Congress. Food Sci. and Technol.*, 1:243.
- Maillet, M. 1980. "*Histología e Histofisiología Humanas*". Ed. M. Maillet. AC Madrid. España.
- M.A.P.A. (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación). 1995. "*La Alimentación en España 1993*". Ed. MAPA. Secretaría General Técnica. España.
- Matsumoto, J.J. 1979. Denaturation of fish muscle proteins during frozen storage/ En "*Proteins at Low Temperature*". Ed. O. Fennema. Am. Chem. Soc., Washington, D.C. EEUU. Pp. 205-224.
- Matsumoto, J.J. 1980. Chemical deterioration of muscle proteins during frozen storage. En "*Chemical deterioration of proteins*". Eds. J.R. Whitaker y M. Fujimaki. ACS Symp. nº 123, Am. Chem. Soc., Washington, D.C., EEUU. Pp. 95-124.
- Matthews, A.D., Park, G.R. and Anderson, E.M. 1980. Evidence for the formation of covalent cross-linked myosin in frozen-stored cod minces. En "*Advances in Fish Science and Technology*". Ed. J.J. Connell. Fishing News Books Ltd. Surrey. Reino Unido. Pp. 438-444.
- Moral, A. y Tejada, M. 1993. Trends in the spanish retail fishery product market. New Market for Seafood Conference. University of Hull International Fisheries Institute (HIFI). 29 Sept.-1 Oct. 1993.
- Morrissey, P.A.; Mulvihill, D.M. y O'Neill, E.M. 1987. Functional properties of muscle proteins. En "*Developments in food proteins-5*". Ed. B.J.F. Hudson. Elsevier Applied Science.

- Londres y Nueva York. Reino Unido y EEUU. Pp. 195-255.
- Nash, T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Antzsch reaction. *Biochem. J.*, 55:416-421.
- Nishiya, K.; Takeda, F.; Tamoto, K.; Tanaka O.; Fukumi T.; Kitabayasi, T. ; Aizawa, S. 1961. Hokkaido Municipal Fish. Exp. Stn. 18:122-135.
- Niwa, E., Kohda, S., Kanoh, S. and Nakayama, T. 1986a. Exposure of hydrophobic amino acid residues from myosin on freezing. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52(12):2127.
- Niwa, E., Kohda, S., Kanoh, S. and Nakayama, T. 1986b. Exposure of hydrophobic amino acid residues from actomyosin on freezing reconfirmation by fluorimetry. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52(6):1039-1042.
- Noguchi, S. y Matsumoto, J.J. 1970. Studies on the control of the denaturation of the fish muscle proteins during the frozen storage-I. preventive effect of Na-glutamato. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 36:1078-1087.
- Obinata, T., Maruyama, K., Sugita, H., Kohama, K., Ebashi, S. 1981. Dynamic aspect of structural proteins in vertebrate skeletal muscle. *Muscle and Nerve*. 4:456-488.
- Ofstad, R., Grahl-Madsen E. y Solberg, C. 1992. Surimi from blue whiting produced on board m/s Uksnoy: process and quality. En "Pelagic Fish. The resource and its exploitation". Eds. J.R. Burt, R. Hardy y K.J. Whittle. Fishing New Books. Londres. Reino Unido. Pp 82-93.
- Ohnishi, M. Rodger, G.W. 1979. Analysis of the salt-soluble protein fraction of cod muscle by gel filtration. En "Advances in fish science and technology". Ed. J.J. Connell. Fishing News Ltd. Surrey. Reino Unido.
- Ohnishi. M.; Tsuchiya, T. y Matsumoto, J.J. 1978. Kinetic study on the denaturation mechanism of carp actomyosin during frozen storage. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 44:27-37.
- Ohta, F. 1985. An evaluation of effect of temperature on denaturation of protein in frozen KCl solution. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 51(3):505.
- Okada, T.; Inowe, N.; Akida, M. 1986. Electron microscopic observation and biochemical properties of carp myosin B during frozen storage. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 52:345-353.
- Ockerman, H.W. 1977. Meat proteins. En "Food Coloids". A VI Publishing Co. Westport, Connecticut. EEUU. P.240.
- Owusu-Ansah Y.J. and Hultin H.O. 1986. Chemical and physical changes in red hake fillets during frozen storage. *J. Food Sci.*, 51:1402-1406.
- Owusu-Ansah, Y.J. y Hultin, H.O. 1987. Effect of *in situ* formaldehyde production on solubility and cross-linking of proteins of minced red hake muscle during frozen storage. *J.*

Food Biochem., 11:17-39.

Parkin, K.L. y Hultin, H.O. 1982. Some factors influencing the production of dimethylamine and formaldehyde in minced and intact red hake muscle. *J. Food Proc. Preserv.* 6:73-97.

Pérez-Martín, R.I., Franco, J.M., Molist, P. y Gallardo, J.M., 1987. Gas chromatographic methods for the determination of volatile amines in sea foods. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 22:509-514.

Peterson, G.L. 1979. Review of the Folin Phenol protein cuantitation method of Lowry, Rosebrough Farr and Randall. *Anal. Bioch.*, 100:201-220.

Phillippy, B.Q. 1983. Characterization of the *in situ* TMAOase system of the red hake muscle. Tesis Doctoral, Universidad de Massachusetts, Amherst. EEUU.

Pierce, K.N. y Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agri. Food Chem.*, 26:716.

Pollard, T., Almo, S., Vinson, S.Q., Vinson, V. y Lattman, E.E. 1994. Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution. *Rev. Cell. Biol.* 10:207-249.

Poulter, R.G. y Lawrie, R.A. 1978. Studies on fish muscle protein: changes in sulphydryl groups and the binding of added formaldehyde during frozen storage. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 11:264-266.

Poulter, R.G. y Lawrie, R.A. 1979. Studies on fish muscle protein: nutritional consequences of adding low concentrations of formaldehyde and/or linoleic acid to cod muscle. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 12:47-51.

Ragnarsson, K. y Regenstein, J.M. 1989. Changes in electrophoretic patterns of gadoids and non-gadoids fish muscle during frozen storage. *J. Food Sci.*, 54(4):819-823.

Rayment, I. y Holden, H.M., 1993. Myosin subfragment-1: structure and function of a molecular motor. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3:944-952.

Reay, G.A. 1933. The influence of freezing temperatures on haddock's muscle. Part I. *J. Soc. Chem. Ind. Lond.* 52:265.

Rehbein, H. 1985. Does formaldehyde form crosslinks between myofibrillar proteins during frozen storage of fish muscle?. *Refrig. Sci. Technol.*, 4:93-99.

Rehbein, H. 1988. Relevance of trimethylamine oxide demethylase activity and haemoglobin content to formaldehyde production and texture deterioration in frozen stored minced fish muscle. *J. Sci. Food Agric.*, 43:261-277.

Rehbein, H. y Karl, H. 1985. Solubilization of fish muscle proteins with buffers containing sodium dodecyl sulfate. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 180:373-378.



- Rha, C. y Pradipasena, P. 1986. Viscosity of proteins. En "Functional Properties of Food Macromolecules". Eds. Mitchell, J.R. y Ledward, D.A. Elsevier Applied Science Publishes, Londres. Pp 79-120.
- Rodger, G. y Hastings, R. 1984. Role of trimethylamine oxide in the freeze denaturation of fish muscle - Is it simply a precursor of formaldehyde?. J.Food Sci. 49:1940-1941.
- Roura, S.I. y Crupkin M., 1995. Biochemical and functional properties of miofibrils from pre and post spawned hake (*Merluccius hubbsi Marini*) stored on ice. J. of Food Sci., 60(2):269-272.
- Roura, S.I., Montecchia C., Goldenberg, A.L., Trucco, R.E. and Crupkin M. 1990. Biochemical and physicochemical properties of actomyosin from pre- and post-spawned hake (*Merluccius hubbsi*) stored on ice. J.Food Sci., 55:688-692.
- Roussel, H. y Cheftel, J.C. 1990. Mechanisms of gelation of sardine proteins: influence of thermal processing and of various additives on the texture and protein solubility of kamaboko gels. Int. J. of Food Sci. and Technol. 25:0-100.
- Seki, N. 1977. Proteins of fish. Koseisha-Koseikaku, K.K. Tokio. Editado por Jpn. Soc. Sci. Fish.
- Seki, N. y Arai, K. 1974. Gel filtration and electrophoresis of fish myofibrillar proteins in the presence of sodium dodecyl sulfate. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 40:(11)1187-1194.
- Shenouda S.Y.K. y Piggot G.M. 1977. Fish myofibrillar protein and lipid interaction in aqueous media as detected by isotope labeling, sucrose gradient centrifugation, polyacrilamide electrophoresis and electron paramagnetic resonance. En "Protein crosslinking: Biochemical and molecular aspects". Ed M. Friedman. Adv. Exper. Med. Biol. 86-A. P.657.
- Shenouda, S.Y.K., 1980. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. Adv. Food Res., 26:275-311.
- Sikorski, Z.E. y Kostuch, S. 1982. Trimethylamine N-Oxide demethylase. Its occurrence, properties and role in technological changes in frozen fish. Food Chem. 9:213-222.
- Sikorski, Z.E. y Kolakowska. 1994. Changes in proteins in frozen stored fish. En "Seafood proteins". Eds. Chapman y Hall. One Penn Plaza. New York (NY), EEUU. Pp. 99-231.
- Silva-Pacheco, J.O. 1987. Yield composition, lipid stability and organoleptic acceptance of farm raised channel catfish (*Ictalurus punctatus*) as affected by fish size and time in frozen storage. Dissertation Abstract International, B 1987, 47(8). 3186: Order no. DA8628646. Mississippi State University. Mississippi, EEUU.
- Simpson M.V. y Haard, N.F. 1987. Temperature acclimation of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) and its influence on freezing point and biochemical damage of postmortem muscle during storage at 0°C and -3°C. J. Food Biochem. 11:69.

- Slinde, E. 1988. The relation between some intrinsic biochemical properties and the quality of meat and fish. En "Functional properties of meat and fish raw material", 29-30 Nov. Göteborg, Suecia.
- Smith, J.G.M., Hatrdy R., Thomson, A.B., Young, K.W. y Parsons, E. 1980. Some observations on the ambient and chill storage of blue whiting (*Micromesistius poutassou*). En "Advances in fish Science and Technology". Ed. J.J. Connell. Fishing News Books Ltd. Farnham, Reino Unido. Pp 299-303.
- Sotelo, C.G., Piñeiro, C. y Pérez-Martín, R.I. 1995. Denaturation of fish proteins during frozen storage: role of formaldehyde. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 200:14-23.
- Sotelo, C.G. y Mackie, I.M. 1993. Protein denaturation in frozen stored hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle: the role of formaldehyde. *Food Chem.*, 43:236-275.
- Squire, J.M. 1994. The actomyosin interaction - shedding light on structural events: "Plus ça change, plus c'est la même chose". *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 15:227-231.
- Stefansson, G. y Hulting, H.O. 1994. On the solubility of cod muscle proteins in water. *J. Agric. Food Chem.*, 42:2656-2664.
- Suzuki, T., 1987. Características del músculo de pescado y de las proteínas de pescado. En "Tecnología de las proteínas del pescado y krill" Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Tanaka, T. 1965. En "The Technology of Fish Utilization". Kreuzer, R.(Ed). Fishing News (Books) Inc. Londres. Reino Unido. Pp 121-125.
- Tejada, M., 1979. Estudios sobre la desnaturalización proteica en pastas de jurel (*Trachurus trachurus* L.) congeladas y conservadas al estado congelado. Tesis doctoral, Fac. de Veterinaria, Univ. Complutense, Madrid.
- Tejada, M. 1995. El frío como método de conservación. Congelación de pescado. Programa de higiene, tecnología y control de calidad de los alimentos. Instituto del Frío, Madrid. España.
- Tejada, M. y Careche, M. 1988. Efecto de la temperatura de conservación (-12°C y -18°C) sobre la estabilidad de músculo de merluza picado. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 28:1.
- Tejada, M., Borderías, A.J., Jiménez-Colmenero, F. 1984. Myofibrillar and sarcoplasmic proteins: their role in alterations in certain functional properties of muscle during frozen storage. Chemical changes during food processing. *Proc. M.O.C.C.A. Vol.I*, p.103-111.
- Tejada, M., Borderías, A.J., Jiménez-Colmenero, F. 1987. Changes during Food Processiong. *Proc. IUFOST Intern. Symp. Chem. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). Valencia*. P.103.
- Tejada, M., Careche, M., Torrejón, P., Del Mazo, M., Solas, M.T., García, M.L. y Barba, C.

1996. Study of protein extracts and aggregates forming in minced cod (*Gadus Morhua*) during frozen storage. J.Sci. Food Agric. En prensa.
- Tokunaga, T. 1974. The effect of decomposed product of TMAO on the quality of frozen Alaska Pollack fillets. Bull Jap. Soc. Sci. Fish., 40:167.
- Tome, D., Kazlowski, A. y Mabon, F. 1985. Carbon-13 NMR study on the combination of formaldehyde with bovine serum albumin. J. Agric. Fd. Chem. 33:449-455.
- Touraille C. y Sale P. 1977. Problèmes posés par l'évaluation de la tendreté de la viande. Les cahiers de l'Ens Bana. 1:18-25.
- Tsuchiya Y. y Tsuchiya T. y Matsumoto, J.J. 1979. The nature of cross bridges constituting aggregates of frozen stored carp myosin and actomyosin. Adv. Fish Sci. Tech. 434-438. Jubilee Conference of the Torry Research Station, Aberdeen, Scotland. Reino Unido.
- Umemoto, S.; Kanna, K. y Iwata, K. 1971. Studies on the quality of frozen stored Alaska Pollack-II. Changes in extractable protein of surimi during cold storage. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 37:(11)1100-1104.
- Vale, R.D., 1994. Getting a grip on myosin. Cell. 78:733-737.
- Vyncke, W. pH of fish muscle: comparison of methods. 1981. Western European Fish Technologist' Association (WEFTA). Copenague, Dinamarca.
- Wagner, J.R. y Añon, M.C. 1986. Effect of frozen storage on protein denaturation in bovine muscle. I. Myofibrillar ATPase activity and differential scanning colorimetric studies. J. Food Technol., 21:9-18.
- Wakameda, A. y Arai, K. 1986. Dissociation of carp myosin B into actin and myosin in the presence of a high concentration of NaCl. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 52(2):293-300.
- Warrick, H.M. y Spudich, J.A. 1987. Myosin structure and function in cell motility. Ann. Rev. Cell Biol. 3:379-421.
- Watabe, S., Dihn, T.N.L., Ochiay, I. y Hashimoto, K. 1983. Immunochemical specificity of myosin light chains from mackerel ordinary and dark muscles. J. Biochem 94:1409-1419.
- Wheaton, S.W. y Lawson, T.B. 1985. By-products. En "Processing aquatic food products". Wiley-Interscience publication. Eds. John Wiley e hijos. New York, EEUU, 425-465.
- Whittle K.J.; Roberston, I. y McDonald, I. 1980. Seasonal variability in blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and its influence on processing. y col., 1980. En "Advances in fish Science and Technology". Ed. J.J. Connell. Fishing News Books Ltd. Farnham, Reino Unido. Pp 378-387.
- Young, J.Z. 1977. En "La vida de los vertebrados". Ed. J.Z. Young. Omega. Barcelona,

España. 170-254.

Xiong, Y. L. 1994. Myofibrillar proteins from different muscle fiber types: implications of biochemical and functional properties in meat processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 34(3):293-320.